

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 336**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2009 E 14192277 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2865760**

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

30 Prioridad:

24.06.2008 EP 08011429

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

13.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 654 336 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

Campo de la invención:

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

Antecedentes de la invención:

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

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

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

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

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

con afinidad elevada al factor de von Willebrand (VWF), el cual lo protege contra un metabolismo prematuro. La semivida de FVIII no activado unido a VWF es de aproximadamente 12 horas en plasma.

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

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

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

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

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

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

Debido a que ninguna de las estrategias descritas anteriormente ha dado como resultado todavía un agente farmacéutico de FVIII aprobado y debido a que la introducción de mutaciones en la secuencia de origen natural de FVIII o la introducción de modificaciones químicas supone al menos un riesgo teórico de que se creen variantes inmunogénicas de FVIII, sigue siendo necesario desarrollar moléculas modificadas del factor de coagulación VIII que exhiban una semivida prolongada.

Teniendo en cuenta el posible riesgo trombogénico, resulta más deseable prolongar la semivida de la forma no activada del FVIII que la del FVIIIa.

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

los multímeros de elevado peso molecular de VWF (VWF-HMWM), se almacenan en los cuerpos de Weibel-Pallade de las células endoteliales o en los Gránulos α de las plaquetas.

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

Los defectos en VWF provocan la enfermedad de von Willebrand (VWD), la cual se caracteriza por un fenotipo hemorrágico más o menos pronunciado. La VWD de tipo 3 es la forma más grave, en la cual VWF está totalmente ausente; la VWD de tipo 1 se relaciona con una pérdida cuantitativa de VWF y su fenotipo puede ser muy leve. La VWD de tipo 2 se relaciona con defectos cualitativos de VWF y puede ser tan grave como la VWD de tipo 3. La VWD de tipo 2 presenta muchas subformas, algunas de las cuales se asocian con la pérdida o la reducción de multímeros de peso molecular elevado. La VWD de tipo 2a se caracteriza por una pérdida de multímeros tanto grandes como intermedios. La VWD de tipo 2B se caracteriza por una pérdida de los multímeros de peso molecular más elevado.

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

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

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

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

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

- Un experto en la técnica no hubiera considerado seriamente una fusión C-terminal, ya que el dominio C2 de FVIII en la parte más C-terminal de FVIII entre el aminoácido 2303 y 2332 de FVIII comprende un sitio de unión a la membrana de las plaquetas, que es esencial para la función de FVIII. Este es el motivo por el cual existen muchas mutaciones de aminoácidos conocidas en esta región que provocan hemofilia A. Por lo tanto, resultó sorprendente que un polipéptido heterólogo relativamente grande como la albúmina se pudiera fusionar en la parte C-terminal de FVIII sin que se suprimiera la función de FVIII mediante la supresión de su unión a las plaquetas. Además, el dominio C2 también contiene un sitio de unión para VWF. Este sitio, junto con la secuencia de aminoácidos 1649-1689, es el responsable de la unión de alta afinidad de FVIII a VWF. Por consiguiente, un experto en la técnica tampoco hubiera esperado que un FVIII con una fusión de albúmina C-terminal conservara su unión a VWF.
- 5
- 10 Sorprendentemente, se observó que, de forma contraria a la predicción de Ballance *et al.*, una fusión de albúmina en el extremo N-terminal de FVIII no fue secretada al medio de cultivo. Por consiguiente y debido a los motivos detallados anteriormente, se acaba de descubrir, aún más sorprendentemente, que un FVIII fusionado en su parte C-terminal con albúmina es secretado al medio de cultivo y conserva su función biológica, incluida la unión a membranas de plaquetas activadas y a VWF.
- 15 También se descubrió, sorprendentemente, que el FVIII modificado de la invención muestra un incremento de la recuperación *in vivo* de aproximadamente un 20% en comparación con FVIII de origen natural.

Descripción de la invención

- Un objetivo de esta invención consiste en proporcionar un FVIII modificado o complejos de FVIII modificado con VWF no modificado que presenten una semivida *in vivo* mejorada.
- 20 La expresión "FVIII modificado", en el sentido de la invención, se refiere a polipéptidos de FVIII que están fusionados con polipéptidos que mejoran la semivida, los cuales engloban también alelos naturales, variantes, deleciones e inserciones de FVIII.
- Otro objetivo de esta invención consiste en proporcionar un FVIII modificado, así como también complejos de FVIII modificado con VWF no modificado que presenten una recuperación *in vivo* mejorada.
- 25 Otro objetivo de la invención consiste en que este FVIII modificado o complejos de FVIII modificado con VWF no modificado, puedan ser expresados por células de mamífero y conserven sus actividades biológicas respectivas.
- En resumen, sorprendentemente el FVIII modificado o complejos de FVIII modificado con VWF no modificado de la invención, han conservado la actividad biológica y han incrementado la semivida *in vivo* y la recuperación *in vivo*.
- 30 Un posible beneficio adicional de aquellas realizaciones de la presente invención en las que se modifica el FVIII y en las que el dominio A2 se mantiene unido únicamente de forma no covalente al dominio A3 tras la activación consiste en que se incrementa únicamente la semivida de la forma no activada de FVIII, mientras que la semivida de la forma activada de FVIII sigue siendo prácticamente la misma, lo que puede dar como resultado una reducción del riesgo de padecer trombogenicidad, en comparación con las variantes de FVIII que conducen a la estabilización de la forma activada de FVIII.
- 35 El FVIII modificado o complejos de FVIII modificado con VWF no modificado de la invención, se pueden generar fusionando un resto de una proteína que mejora la semivida (HLEP, por sus siglas en inglés) con la parte C-terminal de FVIII.
- Las HLEP, en el sentido de la presente invención, se seleccionan a partir de un grupo constituido por miembros de albúmina humana.
- 40 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un FVIII modificado o a FVIII modificado con VWF no modificado, que contienen en la parte C-terminal del FVIII modificado una fusión con una HLEP, que se caracterizan por que el FVIII modificado o el complejo de FVIII modificado con VWF no modificado presenta una semivida funcional prolongada en comparación con la semivida funcional del FVIII de origen natural o del complejo de VWF de origen natural y FVIII de origen natural.
- 45 La presente invención también se refiere a fusiones C-terminales con más de una HLEP, donde la HLEP, la cual está fusionada varias veces.
- La presente invención también se refiere a un FVIII modificado que contiene en la parte C-terminal una fusión con una HLEP, que se caracteriza por que el FVIII modificado o el complejo de FVIII modificado con VWF no modificado presenta una recuperación *in vivo* mejorada en comparación con la recuperación *in vivo* del FVIII de origen natural o el complejo de VWF de origen natural y FVIII de origen natural.
- 50

Otra realización de la invención son polipéptidos de FVIII modificado que contienen en la parte C-terminal una fusión con una HLEP, que se caracterizan por que el FVIII modificado se secreta en un medio de fermentación con un rendimiento mayor que un FVIII de origen natural.

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

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

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

10 (a) cultivar células huésped de la invención en condiciones tales que se exprese el factor de coagulación modificado; y

(b) opcionalmente recuperar el factor de coagulación modificado a partir de las células huésped o a partir del medio de cultivo.

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

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

20 Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un complejo que comprende FVIII y VWF o uno de sus componentes polipeptídicos individuales, donde el FVIII de dicho complejo está fusionado en la parte C-terminal de su producto de traducción primario con la parte N-terminal de un polipéptido que mejora la semivida (HLEP).

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

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

30 (a) el FVIII modificado presenta una semivida funcional prolongada en comparación con la semivida funcional de FVIII de origen natural o

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

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

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

(a) el FVIII modificado presenta una semivida del antígeno prolongada en comparación con la semivida del antígeno de FVIII de origen natural o

45 (b) el complejo que comprende FVIII modificado y VWF no modificado presenta una semivida del antígeno prolongada en comparación con la semivida del antígeno del complejo correspondiente que comprende FVIII de origen natural y VWF de origen natural.

Una realización preferida de la invención consiste en un polipéptido modificado o un complejo que comprende dicho polipéptido modificado o un complejo que comprende dichos polipéptidos modificados según se han descrito

anteriormente, donde el polipéptido modificado presenta un incremento de la semivida del antígeno de al menos un 25% en comparación con la semivida del antígeno del polipéptido correspondiente de origen natural o el complejo que comprende dicho polipéptido modificado o un complejo que comprende dichos polipéptidos modificados presenta un incremento de la semivida del antígeno de al menos un 25% en comparación con el complejo correspondiente de FVIII de origen natural y VWF de origen natural.

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

(a) el FVIII modificado presenta un incremento de la recuperación *in vivo* en comparación con la recuperación *in vivo* de FVIII de origen natural o

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

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

20 Otra realización preferida de la invención consiste en

(a) un polipéptido modificado o un complejo que comprende dicho polipéptido modificado o un complejo que comprende dichos polipéptidos modificados según se ha descrito anteriormente, donde al menos un componente polipeptídico de dicho complejo está fusionado en el aminoácido C-terminal de su producto de traducción primario con la parte N-terminal de una HLEP, o

25 (b) un polipéptido modificado o un complejo que comprende dicho polipéptido modificado o un complejo que comprende dichos polipéptidos modificados según se ha descrito anteriormente, donde al menos un componente polipeptídico de dicho complejo está fusionado en la parte C-terminal de su producto de traducción primario con el aminoácido N-terminal de una HLEP, o

30 (c) un polipéptido modificado o un complejo que comprende dicho polipéptido modificado o un complejo que comprende dichos polipéptidos modificados según se ha descrito anteriormente, donde al menos un componente polipeptídico de dicho complejo está fusionado en el aminoácido C-terminal de su producto de traducción primario con el aminoácido N-terminal de una HLEP.

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

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

45 En la invención también se engloba el uso de un FVIII modificado como el preparado mediante el método descrito anteriormente y VWF de origen natural para la elaboración de un preparado farmacéutico combinado para su uso simultáneo, secuencial o por separado en la terapia de trastornos hemorrágicos, preferentemente en la terapia de la hemofilia A y/o la enfermedad de von Willebrand.

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

50

Los términos “fusionar” o “fusionado” se refieren a la adición de aminoácidos a la parte C-terminal de FVIII. Cuando en la presente se hace referencia a una “fusión con el aminoácido C-terminal de FVIII”, esto significa una fusión exactamente con el aminoácido C-terminal de FVIII en el aminoácido 2332 de la secuencia de ADNc del FVIII maduro de origen natural. El FVIII maduro se refiere al polipéptido respectivo después de la escisión del propéptido.

Sin embargo, la invención también engloba una “fusión con la parte C-terminal de FVIII”, que en el sentido de esta invención también puede incluir respectivamente una fusión con una molécula de FVIII en la cual se han suprimido una o más posiciones aminoácídicas hasta un máximo de n aminoácidos a partir del aminoácido C-terminal de FVIII. La cifra n es un número entero que no debería ser superior a un 5%, preferentemente no debería ser superior a un 1% del número total de aminoácidos del FVIII. Normalmente, n es 20, preferentemente 15, más preferentemente 10, aún más preferentemente 5 o inferior (p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5).

En una realización, el FVIII modificado presenta la siguiente estructura:

$N - FVIII - C - L1 - H$, [fórmula 1]

donde

N es una parte N-terminal de FVIII,

$L1$ es un enlace químico o una secuencia conectora

H es una HLEP y

C es una parte C-terminal de FVIII.

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

Más adelante se describen las secuencias de HLEP preferidas. Del mismo modo, en la invención se engloban 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 más aminoácidos de la HLEP.

El FVIII modificado o el complejo del FVIII modificado con el VWF no modificado de la invención puede comprender más de una secuencia de HLEP, p. ej., dos o tres secuencias de HLEP. Estas múltiples secuencias de HLEP pueden estar fusionadas con la parte C-terminal de FVIII en tándem, p. ej., como repeticiones sucesivas.

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

Por consiguiente, la presente invención engloba además FVIII modificado que no está presente como un polipéptido monocaténario, sino que está constituido por varios polipéptidos (p. ej., uno o dos o tres) que están asociados entre sí mediante uniones no covalentes.

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

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

La secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos de la forma de origen natural madura del FVIII humano de coagulación de la sangre se muestran en la SEQ ID NO:14 y la SEQ ID NO:15, respectivamente. La referencia a una posición aminoácídica de una secuencia específica se refiere a la posición de dicho aminoácido en la proteína FVIII

de origen natural y no excluye la presencia de mutaciones, p. ej., deleciones, inserciones y/o sustituciones en otras posiciones de la secuencia a la que se hace referencia. Por ejemplo, una mutación en "Glu2004" referente a la SEQ ID NO:15 no excluye el hecho de que, en el homólogo modificado, falten uno o más aminoácidos en las posiciones 1-2332 de la SEQ ID NO:15.

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

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

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

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

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

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

Tabla 1:

(1)	Alanina	Glicina
(2)	Ácido aspártico	Ácido glutámico

(3)	Asparagina	Glutamina	Serina	Treonina
(4)	Arginina	Histidina	Lisina	
(5)	Isoleucina	Leucina	Metionina	Valina
(6)	Fenilalanina	Tirosina	Triptófano	

Se pueden fusionar una o más HLEP con la parte C-terminal de FVIII preferentemente, para no interferir con las capacidades de unión de FVIII, por ejemplo, a VWF, plaquetas o FIX.

5 Una vez que se ha activado el FVIII endógenamente durante la coagulación in vivo, puede que ya no sea deseable mantener la semivida funcional incrementada del FVIII ahora activado, ya que esto podría conducir a complicaciones trombóticas, que ya es el caso para un factor de coagulación activado de origen natural como FVIIa (Aledort 2004. J Thromb Haemost 2:1700-1708) y que podría ser más relevante si el factor activado tuviera una semivida funcional incrementada. Por consiguiente, otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar moléculas de FVIII de vida prolongada, las cuales, tras la activación endógena in vivo o tras la disponibilidad de un cofactor, tengan una semivida funcional comparable a la de FVIII no modificado. Esto se puede conseguir, a modo de ejemplo no limitante, introduciendo un sitio de escisión, por ejemplo, para un factor de coagulación entre la parte C-terminal de FVIII y la HLEP. Con tales secuencias que conectan FVIII-HLEP, la activación de la proteína química FVIII de la invención conducirá a una separación completa concomitante de FVIIIa respecto al resto de HLEP. Por consiguiente, en una realización, la semivida funcional del FVIII modificado activado endógenamente es sustancialmente la misma que la del FVIII de origen natural activado (p. ej., $\pm 15\%$, preferentemente $\pm 10\%$).

En otra realización más de la invención, sin embargo, uno o más de los sitios de escisión proteolítica, preferentemente los sitios de escisión de trombina en Arg 740 y/o Arg372, se mutan o suprimen con el fin de evitar la escisión y esto da como resultado una proteína de inserción que presenta unas propiedades mejoradas como una semivida funcional mejorada incluso como molécula activada.

20 En otra realización de la invención, las proteínas FVIII de la invención se pueden expresar como dos cadenas separadas (remítase más adelante).

El FVIII modificado de acuerdo con esta invención puede ser un polipéptido monocatenario, o puede estar constituido por dos o tres cadenas polipeptídicas que se asocian mediante uniones no covalentes, debido a un procesamiento proteolítico.

25 En otra realización de la invención, los aminoácidos del sitio de escisión de PACE/Furina (Arg1648) o cercanos a este se mutan o suprimen con el fin de evitar la escisión por parte de PACE/Furina. Se cree que esto da como resultado una molécula de fusión FVIII/HLEP monocatenaria con una semivida mejorada.

30 En una realización de la invención, el FVIII modificado de la invención exhibe una mayor semivida funcional en comparación con la forma de FVIII correspondiente que no contiene HLEP integrada y/o con la forma de FVIII de origen natural. La semivida funcional se puede determinar, p. ej., in vivo en modelos animales de hemofilia A, como ratones en los que se ha suprimido el FVIII, en los que cabría esperar un efecto hemostático más prolongado en comparación con FVIII de origen natural. El efecto hemostático se podría evaluar, por ejemplo, determinando el tiempo necesario para detener la hemorragia tras el pinzamiento de la cola.

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

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

45 Como marcador alternativo para la semivida de la actividad biológica, también se pueden medir los niveles de antígeno del FVIII modificado o, respectivamente, de origen natural, o los niveles del VWF de origen natural. Por lo

tanto, en la invención también se engloban moléculas de FVIII modificadas que contienen en la parte C-terminal de FVIII una fusión con una HLEP, caracterizadas por que el FVIII modificado o el complejo del FVIII modificado con VWF no modificado presenta una semivida prolongada del antígeno de FVIII en comparación con la semivida del antígeno de FVIII que carece de dicha inserción. La "semivida del antígeno de FVIII" de acuerdo con la presente invención es la semivida del antígeno del FVIII una vez que se ha administrado a un mamífero y se mide *in vitro*. El experto conocerá métodos de prueba de antígenos basados en anticuerpos específicos en un formato de inmunoensayo enzimático y estos se pueden adquirir de proveedores comerciales (p. ej., Dade Behring, Instrumentation Laboratory, Abbott Laboratories, Diagnostica Stago). Las semividas funcionales y del antígeno se pueden calcular utilizando los puntos de evaluación de la fase beta de eliminación de acuerdo con la fórmula $t_{1/2} = \ln 2 / k$, donde k es la pendiente de la recta de regresión.

En otra realización, la semivida funcional del FVIII modificado activado endógenamente se prolonga en comparación con la del FVIII de origen natural activado. El incremento puede ser superior a un 15%, por ejemplo, de al menos un 20% o al menos un 50%. De nuevo, tales valores de semivida funcional se pueden medir y calcular según se ha descrito para las semividas funcionales anteriormente. Las semividas incrementadas de las moléculas de FVIII modificado activado endógenamente pueden resultar beneficiosas en situaciones en las que se encuentran disponibles unos niveles de FVIII tan solo muy bajos que, por consiguiente, no son trombogénicos. Tales situaciones se pueden producir, p. ej., tras un tratamiento de terapia génica, en el que a menudo se pueden obtener tan solo unas tasas de expresión bajas. Por consiguiente, tales moléculas de FVIII estabilizado podrían resultar beneficiosas, p. ej., en la terapia génica, a pesar del riesgo trombogénico asociado a tales moléculas de FVIII si se administran como proteínas en dosis fisiológicas o elevadas.

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

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

En otra realización más de la invención, se utilizan regiones constantes de inmunoglobulina o sus porciones como HLEP. Preferentemente, se utiliza la región Fc que comprende un dominio CH2 y CH3 y una región bisagra de una IgG, más preferentemente de una IgG1 o sus fragmentos o variantes, incluyendo las variantes mutaciones que mejoran la unión al receptor de Fc neonatal (FcRn).

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

Otra realización más de la invención son polipéptidos FVIII modificados que están fusionados con una HLEP, por ejemplo, albúmina en la parte C-terminal de la molécula de FVIII, los cuales presentan una reducción de la unión a VWF o no se unen a VWF en absoluto.

Secuencias conectoras

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

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

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

Los conectores escindibles deben ser lo suficientemente flexibles para permitir una escisión por parte de proteasas. En una realización preferida, la escisión del conector procede de forma comparablemente rápida como la activación de FVIII en la proteína de fusión, si la proteína de fusión es un FVIII modificado.

El conector escindible comprende preferentemente una secuencia derivada de

- 5 a) el polipéptido terapéutico que se ha de administrar en sí, si contiene sitios de escisión proteolítica que se escinden proteolíticamente durante la activación del polipéptido terapéutico,
 - b) un polipéptido sustrato escindido por una proteasa que se activa o forma mediante la intervención del polipéptido terapéutico,
 - c) un polipéptido que interviene en la coagulación o la fibrinólisis.
- 10 La región conectora, en una realización más preferida, comprende una secuencia de FVIII y/o VWF, que debería dar como resultado una reducción del riesgo de obtener propiedades neoantigénicas de la proteína de fusión expresada. Además, en el caso de que la proteína terapéutica sea FVIII, que requiere ser activado proteolíticamente, la cinética de la escisión del conector peptídico reflejará más de cerca la cinética de activación relacionada con la coagulación del zimógeno.
- 15 En una realización preferida, el polipéptido terapéutico es un zimógeno de FVIII y la HLEP es albúmina. En este caso, la secuencia conectora o bien deriva de las secuencias de las regiones activadas de FVIII, de la región de escisión de cualquier sustrato de FIX como FX o FVIII, o de la región de escisión de cualquier polipéptido sustrato que sea escindido por una proteasa en cuya activación intervenga FIXa.
- 20 En una realización muy preferida, el péptido conector deriva de FVIII en sí y comprende secuencias que engloban los sitios de escisión de la trombina en las posiciones aminoacídicas 372, 740 y 1689 de la SEQ ID NO. 15, respectivamente. En otra realización preferida, el péptido conector deriva de FX, FIX, FVII o FXI.

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

Dichas secuencias conectoras también se pueden utilizar en el VWF modificado de la invención.

- 25 Algunas combinaciones ilustrativas del polipéptido terapéutico, conector escindible y HLEP incluyen los constructos enumerados en el documento WO2007/090584 (por ejemplo, en la Tabla 2 y la Figura 4) y el documento WO2007/144173 (por ejemplo, en la Tabla 3a y 3b), pero no se limitan a estos.

Polipéptidos que mejoran la semivida (HLEP)

- 30 Un "polipéptido que mejora la semivida", tal como se utiliza en la presente, se selecciona del grupo constituido por la albúmina. Puede ser una proteína que mejora la semivida de longitud completa descrita en la presente o uno o más de sus fragmentos que sean 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
- 35 contiguos de la secuencia de HLEP o pueden incluir todos o parte de 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 FVIII de origen natural o VWF de origen natural.

- 40 La porción de HLEP de los constructos de inserción del factor de coagulación propuestos de la invención puede ser una variante de una HLEP normal. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, ya sean conservativas o no conservativas, donde tales cambios no alteran sustancialmente el centro activo o dominio activo que confiere las actividades biológicas del FVIII modificado o VWF modificado.

- 45 En particular, los constructos de fusión FVIII HLEP o VWF HLEP propuestos de la invención pueden incluir variantes polimórficas de origen natural de HLEP y fragmentos de HLEP. La HLEP puede derivar de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, mono, vaca, oveja o cerdo. Las HLEP que no son de mamífero incluyen, sin carácter limitante, las de gallina o salmón.

Albúmina como HLEP

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

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

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

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

Polinucleótidos

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

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

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

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

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

La invención también se refiere a un grupo de plásmidos o vectores que comprenden el grupo anterior de polinucleótidos. Un primer plásmido o vector puede contener dicho primer polinucleótido y un segundo plásmido o vector puede contener dicho segundo polinucleótido. A modo de ejemplo y haciendo referencia al factor de coagulación FVIII, las secuencias codificantes del péptido señal, los dominios A1 y A2, el resto de la secuencia del dominio B y la HLEP se pueden clonar en el primer vector de expresión y las secuencias codificantes de A3, C1 y C2 con una secuencia adecuada de péptido señal se pueden clonar en el segundo vector de expresión. Ambos vectores de expresión se cotransfectan en una célula huésped adecuada, que conducirá a la expresión de las cadenas ligera y pesada de la molécula de FVIII de la invención y la formación de una proteína funcional.

Como alternativa, la secuencia codificante del péptido señal de FVIII, los dominios A1 y A2 se clonan en el primer vector de expresión y las secuencias codificantes de HLEP, A3, C1 y C2 de FVIII con una secuencia adecuada de péptido señal se clonan en el segundo vector de expresión. Ambos vectores de expresión se cotransfectan en una

célula huésped adecuada, que conducirá a la expresión de las cadenas ligera y pesada de la molécula de FVIII de la invención y la formación de una proteína funcional.

Como alternativa, ambas secuencias codificantes se clonan en un vector de expresión, ya sea utilizando dos secuencias promotoras separadas o un promotor y un elemento de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) para dirigir la expresión de ambas cadenas de FVIII.

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

Las células huésped de la invención se pueden emplear en un método para producir un factor de coagulación modificado, preferentemente una molécula de FVIII modificado, que forma parte de esta invención. El método comprende:

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

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

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

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

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

Expresión de los mutantes propuestos

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

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

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

Las unidades de transcripción que codifican los ADN correspondientes también se pueden introducir en células animales junto con otro gen recombinante que pueda actuar como marcador seleccionable dominante en estas células con el fin de facilitar el aislamiento de clones celulares específicos que hayan integrado el ADN recombinante en su genoma. Algunos ejemplos de este tipo de genes marcadores seleccionables dominantes son la

aminoglicósido-fosfotransferasa de Tn5, que confiere resistencia a la geneticina (G418), la higromicina-fosfotransferasa, que confiere resistencia a la higromicina, y la puromicina-acetiltransferasa, que confiere resistencia a la puromicina. El vector de expresión recombinante que codifica un marcador seleccionable de este tipo puede residir ya sea en el mismo vector, como codificador del ADNc de la proteína deseada, o puede ser codificado por un vector diferente que se introduzca de forma simultánea y se integre en el genoma de la célula huésped, lo cual da como resultado frecuentemente una conexión física estrecha entre las diferentes unidades de transcripción.

Otros tipos de genes marcadores seleccionables que se pueden utilizar junto con los ADNc de la proteína deseada se basan en varias unidades de transcripción que codifican la dihidrofolato-reductasa (dhfr). Tras la introducción de este tipo de gen en células que carecen de actividad dhfr endógena, preferentemente células CHO (DUKX-B11, DG-44), este permitirá que dichas células crezcan en medios que carecen de nucleósidos. Un ejemplo de un medio de este tipo es F12 de Ham sin hipoxantina, timidina ni glicina. Estos genes dhfr se pueden introducir conjuntamente con las unidades de transcripción de ADNc de FVIII en células CHO del tipo anterior, tanto unidos al mismo vector o en vectores diferentes, con lo que se crean líneas celulares dhfr-positivas que producen proteína recombinante.

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

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

Purificación y formulación

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Figuras

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

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

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

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

- Figura 5:** Comparación de los parámetros farmacocinéticos de rVWF humano de origen natural y rVWF-FP tras la inyección i.v. de 100 IU de VWF:Ag en ratas (media, n=2-3 /punto de evaluación).
45

Ejemplos:

Ejemplo 1: Generación de vectores de expresión para moléculas de FVIII con fusión a albúmina C-terminal

- En primer lugar se utilizó un plásmido de expresión basado en pIRESpuo3 (BD Biosciences) que contenía la
50 secuencia de ADNc de FVIII de longitud completa en su sitio de clonación múltiple (pF8-FL) para crear un FVIII con el dominio B suprimido. Con este fin, se utilizaron los oligonucleótidos F8-1 y F8-2 (SEQ ID NO 1 y 2) en un experimento de mutagénesis dirigida al sitio de acuerdo con protocolos estándar (kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange XL, Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.) utilizando pF8-FL como molde para eliminar el dominio B. En

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabla 2:

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

Ejemplo 3: Incremento de la tasa de expresión de la proteína de fusión FVIII-albúmina

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

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

Ejemplo 4: Purificación de proteínas FVIII

Se añadió una cantidad suficiente de una resina de afinidad inmunitaria al sobrenadante de expresión que contenía la molécula de FVIII para que se uniera a la actividad de FVIII casi completamente. La resina de afinidad inmunitaria se había preparado uniendo covalentemente un MAb anti-FVIII adecuado a una resina Sephacryl S1000 empleada como soporte. Después de lavar la resina, se introdujo en una columna cromatográfica y se lavó de nuevo. La elución se llevó a cabo utilizando un tampón que contenía CaCl_2 250 mM y etilenglicol al 50%.

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

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

Ejemplo 5: Análisis de la actividad y el antígeno de FVIII

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

El antígeno de FVIII (FVIII:Ag) se determinó mediante ELISA, cuyo rendimiento es conocido por los expertos en la técnica. Resumiendo, se incubaron microplacas con 100 μL por pocillo del anticuerpo de captura (IgG anti-FVIII humano de oveja, Cedarlane CL20035K-C, con un factor de dilución 1:200 en Tampón A [Sigma C3041]) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las placas tres veces con tampón B (Sigma P3563), se incubaron diluciones en serie de la muestra de prueba en tampón diluyente para la muestra (Cedarlane), así como también diluciones en serie de un preparado de FVIII (CSL Behring; 200 - 2 mU/mL) en tampón diluyente para la muestra (volúmenes por pocillo: 100 μL), durante dos horas a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado con tampón B, se añadieron 100 μL de una dilución 1:2 en tampón B del anticuerpo de detección (IgG anti-FVIII humano

de oveja, Cedarlane CL20035K-D, marcada con peroxidasa) a cada pocillo y se incubaron durante otra hora a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado con tampón B, se añadieron 100 µL de solución de sustrato (1:10 (v/v) TMB OUVF : tampón de TMB OUVG, Dade Behring) por pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µL de solución de detención (Dade Behring, OSFA) preparó las muestras para su lectura en un lector de microplacas adecuado a una longitud de onda de 450 nm. A continuación, se calcularon las concentraciones de las muestras de prueba utilizando la curva patrón con el preparado de FVIII como referencia.

Ejemplo 6: Evaluación de los parámetros farmacocinéticos de FVIII-FP en ratones en los que se ha suprimido VWF tras una única inyección i.v.

Con el fin de comparar los parámetros farmacocinéticos de FVIII de origen natural (ADN 457) y FVIII-FP C-terminal (ADN 1656), ambas variantes de FVIII se administraron por vía intravenosa a ratones. Se seleccionó una cepa de ratón en la que se había suprimido VWF (Denis C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, Vol. 95, 9524-9529) ya que, entre otras funciones, VWF actúa como portador y proteína estabilizante para FVIII, de este modo protege a FVIII frente a su degradación prematura, p. ej., por parte de proteasas, y frente a su eliminación prematura de la circulación. Para un FVIII no modificado, es esencial una interacción sin perturbaciones con VWF, según ilustran los casos de hemofilia A, provocados por una mutación en la región C-terminal, que provoca una reducción de la unión a VWF. En el caso de FVIII modificado, tal unión puede ser, a pesar de ello, incluso indeseada, con el fin de examinar o conseguir unos parámetros farmacocinéticos mejorados. Por consiguiente, se inyectaron ambos productos por vía i.v. con una dosis de 100 U (FVIII:Ag)/kg en bolo a dos grupos de ratones (tabla 3). Se tomaron muestras de sangre de forma retroorbital en intervalos adecuados, empezando 5 minutos después de la aplicación de las sustancias de prueba y hasta las 24 horas. Se tomó una muestra de sangre / ratón, se procesó hasta obtener el plasma y se guardó congelada a -20 °C hasta el análisis. Se cuantificó la concentración de FVIII:Ag humano utilizando un ensayo ELISA específico para FVIII humano o mediante un ELISA mixto específico para FVIII y albúmina humana, respectivamente. La concentración en plasma media de las muestras agrupadas para cada punto de evaluación se utilizó para calcular los parámetros farmacocinéticos. La semivida se calculó utilizando los puntos de evaluación de la fase beta de la eliminación de acuerdo con la fórmula $t_{1/2} = \ln 2 / k$, donde k es la pendiente de la recta de regresión. El resultado se representa en la figura 2. Sorprendentemente, FVIII-FP 1656 ($t_{1/2} = 3.06$ h, entre 5 y 960 min) presentó una semivida terminal aproximadamente 3-4 veces más prolongada en comparación con FVIII de origen natural ($t_{1/2} = 0.8$ h, entre 5 y 240 min). Además, la recuperación de FVIII-FP 1656 se incrementó aproximadamente un 20% en comparación con FVIII de origen natural (tabla 4).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Se filtraron de forma estéril sobrenadantes de cultivos celulares que contenían VWF de origen natural (rVWF de origen natural) o proteína de fusión VWF-albúmina (rVWF-FP) a través de un filtro de 0.2 µm y se sometieron a diálisis frente a un tampón de equilibración (EB: Tris-HCl 10mM, CaCl₂ 10mM, pH 7.0). A continuación, este material se aplicó a una columna de Heparina Fractogel equilibrada con EB. La columna se lavó con EB y las proteínas VWF se eluyeron con NaCl 500mM en EB. El pico de elución se concentró y se sometió a diálisis frente a un tampón de FB (3 g/L de cloruro de sodio, 20 g/L de glicina, 5.5 g/L de citrato de trisodio dihidratado, pH 7.0). Finalmente, el material se filtró de forma estéril y se congeló en alícuotas. Cuando procedió, se aplicaron pasos de purificación adicionales que comprendieron cromatografía de intercambio aniónico y/o catiónico, HIC y SEC.

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

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

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

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

Para los análisis farmacocinéticos, se determinó el antígeno de VWF mediante ELISA, cuyo rendimiento es conocido por los expertos en la técnica. Resumiendo, se incubaron microplacas con 100 µL por pocillo del anticuerpo de captura (IgG anti-VWF humano de conejo, Dako A0082 [Dako, Hamburg, Alemania], con un factor de dilución 1:2000 en tampón A [Sigma C3041, Sigma-Aldrich, Munich, Alemania]) durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas tres veces con tampón B (Sigma P3563), cada pocillo se incubó con 200 µL de tampón

C (Sigma P3688) durante 1.5 horas a temperatura ambiente (bloqueo). Después de otros tres pasos de lavado con tampón B, se incubaron diluciones en serie de la muestra de prueba en tampón B, así como también diluciones en serie de plasma humano patrón (ORKL21; 20 - 0.2 mU/mL; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania) en tampón B (volúmenes por pocillo: 100 µL), durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado con tampón B, se añadieron 100 µL de una dilución 1:16 000 en tampón B del anticuerpo de detección (IgG anti-VWF humano de conejo, Dako P0226, marcada con peroxidasa) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado con tampón B, se añadieron 100 µL de solución de sustrato (OUVF, Siemens Healthcare Diagnostics) por pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µL de solución de detención no diluida (OSFA, Siemens Healthcare Diagnostics) preparó las muestras para su lectura en un lector de microplacas adecuado a una longitud de onda de 450 nm. A continuación, se calcularon las concentraciones de las muestras de prueba utilizando la curva patrón con el plasma humano patrón como referencia.

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

El análisis de los multímeros de VWF se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa-SDS según se ha descrito recientemente (Tatewaki *et al.*, *Thromb. Res.* 52: 23-32 (1988) y Metzner *et al.*, *Haemophilia* 4 (Supl. 3): 25-32 (1998)) con modificaciones minoritarias. Resumiendo, tras la equilibración en tampón de análisis listo para usar, se utilizaron minigeles de agarosa al 1% (BioRad) para estandarizar el método en la medida de lo posible. Se sometieron cantidades comparables del antígeno de VWF a electroforesis en geles de agarosa-SDS. Tras la inmunotransferencia de Western, las bandas de proteína VWF se detectaron utilizando los anticuerpos anti-VWF (DAKO, N.º de prod. 0854) o anti-albúmina seguidos de los anticuerpos anti-IgG marcados con fosfatasa alcalina (SIGMA, N.º de prod 1305) y el color de la reacción se cuantificó por densitometría.

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

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

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

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

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

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CSL BEHRING GMBH CSL BEHRING GMBH

<120> Factor VIII con semivida prolongada

<130> 2008_M004_A145

<150> EP 08011429.1

<151> 24-06-2008

<150> EP 0976 8986.3

<151> 24-06-2009

<160> 25
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 < 211> 36
 5 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Cebador
 <400> 1
 10 caatgccatt gaaccaagac gagaaataac tcgtac 36
 <210> 2
 < 211> 36
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 15 <220>
 < 223> Cebador
 <400> 2
 gtacgagtta ttctcgtct tgggtcaatg gcattg 36
 <210> 3
 20 < 211> 48
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Cebador
 25 <400> 3
 caatgccatt gaaccaagac gtcgtggtcg acgagaaata actcgtac 48
 <210> 4
 < 211> 48
 < 212> ADN
 30 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Cebador
 <400> 4
 gtacgagtta ttctcgtcg accacgacgt ctgggtcaa tggcattg 48
 35 <210> 5
 < 211> 23
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 40 < 223> Cebador
 <400> 5
 cattattccg gatcaatcaa tgc 23
 <210> 6
 < 211> 38
 45 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Cebador

ES 2 654 336 T3

<400> 6
 acgcggccgc ggtaccggtg tagaggctct gtgcctcg 38
 <210> 7
 < 211> 31
 5 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Cebador
 <400> 7
 10 gtgaccggtg atgcacacaa gagtgaggtt g 31
 <210> 8
 < 211> 32
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 15 <220>
 < 223> Cebador
 <400> 8
 cacgcggccg cctataagcc taaggcagct tg 32
 <210> 9
 20 < 211> 2016
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <400> 9
 Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
 1 5 10 15
 Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
 20 25 30
 Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
 35 40 45
 Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
 50 55 60
 25 Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val

ES 2 654 336 T3

65	70	75	80
Tyr Asp Thr Val	Val ₈₅ Ile Thr Leu Lys	Asn ₉₀ Met Ala Ser His	Pro ₉₅ Val
Ser Leu His	Ala ₁₀₀ Val Gly Val Ser	Tyr ₁₀₅ Trp Lys Ala Ser	Glu ₁₁₀ Gly Ala
Glu Tyr Asp	Asp ₁₁₅ Gln Thr Ser	Gln ₁₂₀ Arg Glu Lys Glu	Asp ₁₂₅ Asp Lys Val
Phe Pro Gly	Gly Ser His Thr	Tyr ₁₃₅ Val Trp Gln	Val ₁₄₀ Leu Lys Glu Asn
Gly ₁₄₅ Pro Met Ala Ser	Asp ₁₅₀ Pro Leu Cys Leu	Thr ₁₅₅ Tyr Ser Tyr Leu	Ser ₁₆₀
His Val Asp	Leu ₁₆₅ Val Lys Asp Leu Asn	Ser ₁₇₀ Gly Leu Ile Gly	Ala ₁₇₅ Leu
Leu Val Cys	Arg ₁₈₀ Glu Gly Ser Leu	Ala ₁₈₅ Lys Glu Lys Thr	Gln ₁₉₀ Thr Leu
His Lys Phe	Ile ₁₉₅ Leu Leu Phe	Ala ₂₀₀ Val Phe Asp Glu	Gly ₂₀₅ Lys Ser Trp
His Ser ₂₁₀ Glu Thr Lys Asn	Ser ₂₁₅ Leu Met Gln Asp	Arg ₂₂₀ Asp Ala Ala Ser	
Ala Arg Ala Trp Pro	Lys ₂₃₀ Met His Thr Val	Asn ₂₃₅ Gly Tyr Val Asn	Arg ₂₄₀
Ser Leu Pro Gly	Leu ₂₄₅ Ile Gly Cys His	Arg ₂₅₀ Lys Ser Val Tyr	Trp ₂₅₅ His
Val Ile Gly	Met ₂₆₀ Gly Thr Thr Pro	Glu ₂₆₅ Val His Ser Ile	Phe ₂₇₀ Leu Glu
Gly His Thr	Phe ₂₇₅ Leu Val Arg	Asn ₂₈₀ His Arg Gln Ala	Ser ₂₈₅ Leu Glu Ile
Ser Pro ₂₉₀ Ile Thr Phe Leu Thr	Ala ₂₉₅ Gln Thr Leu	Leu ₃₀₀ Met Asp Leu Gly	
Gln Phe Leu Leu Phe	Cys ₃₁₀ His Ile Ser Ser	His ₃₁₅ Gln His Asp Gly	Met ₃₂₀
Glu Ala Tyr Val	Lys ₃₂₅ Val Asp Ser Cys	Pro ₃₃₀ Glu Glu Pro Gln	Leu ₃₃₅ Arg
Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp			

ES 2 654 336 T3

340										345					350				
Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Phe				
		355					360					365							
Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	Trp	Val	His				
	370					375					380								
Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	Leu	Val	Leu				
385					390					395					400				
Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	Gly	Pro				
				405					410					415					
Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met	Ala	Tyr	Thr				
			420					425					430						
Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	Ser	Gly	Ile				
		435					440					445							
Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile				
	450					455					460								
Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	His	Gly	Ile				
465					470					475					480				
Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	Val	Lys				
				485					490					495					
His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Tyr	Lys				
			500					505					510						
Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys				
		515					520					525							
Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala				
	530					535					540								
Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp				
545					550					555					560				
Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Leu	Phe				
				565					570					575					
Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn	Ile	Gln				
			580					585					590						
Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Phe				
		595					600					605							
Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	Phe	Asp	Ser				

ES 2 654 336 T3

610	615	620
Leu Gln Leu Ser Val Cys 625 630	Leu His Glu Val Ala 635	Tyr Trp Tyr Ile Leu 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 Arg Arg Gly Arg Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu 740 745 750		
Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu 755 760 765		
Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser 770 775 780		
Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val 785 790 795 800		
Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg 805 810 815		
Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe 820 825 830		
Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu 835 840 845		
Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val 850 855 860		
Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr 865 870 875 880		
Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly		

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

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

5

<220>
 <223> Cebador

<400> 10
 gcgaccggtg atgacaactc tccttccttt a 31

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

15 <220>
 <223> Cebador

<400> 11
 gcgaccggtc caagtttag gatgcttctt g 31

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

<220>
 <223> Cebador

25 <400> 12
 gcgaccggtt cgagcggggg atctggc 27

<210> 13
 <211> 28

ES 2 654 336 T3

< 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador

5 <400> 13
gcgaccgggtg gatcccgacc ctccagag 28

<210> 14
< 211> 7020

< 212> ADN
10 < 213> Homo sapiens

<400> 14

```

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120
gggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggctcta ccatccaggc tgaggtttat 300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctgtt 360
gggtgtatcct actggaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg 480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa 600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat 720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atgggttatgt aaacaggctc 780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgtgat tggaatgggc 840
accactctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat 900
cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960
gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa 1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggg caggtttgat 1140
gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact 1200
tggttacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc 1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg 1320
aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg ggggaagttg agacacactg 1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaagggtg taaaacattt gaaggatttt 1560

```

ccaattctgc	caggagaaat	attcaaatat	aatggacag	tgactgtaga	agatgggcca	1620
actaaatcag	atcctcgggtg	cctgaccgc	tattactcta	gtttcgtaa	tatggagaga	1680
gatctagctt	caggactcat	tgccctctc	ctcatctgct	acaaagaatc	tgtagatcaa	1740
agaggaaacc	agataatgtc	agacaagagg	aatgtcatcc	tgttttctgt	at ttgatgag	1800
aaccgaagct	ggtacctcac	agagaatata	caacgctttc	tcccaatcc	agctggagtg	1860
cagcttgagg	atccagagtt	ccaagcctcc	aacatcatgc	acagcatcaa	tggctatggt	1920
tttgatagtt	tgagttgtc	agtttgtttg	catgaggtgg	catactggta	cattctaagc	1980
attggagcac	agactgactt	cctttctgtc	ttcttctctg	gatatacctt	caaacacaaa	2040
atggtctatg	aagacacact	cacctattc	ccattctcag	gagaaactgt	cttcatgtcg	2100
atggaaaacc	caggtctatg	gattctgggg	tgccacaact	cagactttcg	gaacagaggc	2160
atgaccgcct	tactgaaggt	ttctagttgt	gacaagaaca	ctggtgatta	ttacgaggac	2220
agttatgaag	atatttcagc	atacttgctg	agtaaaaaca	atgccattga	accaagaagc	2280
ttctcccaga	attcaagaca	ccctagcact	aggcaaaagc	aatttaatgc	caccacaatt	2340
ccagaaaatg	acatagagaa	gactgaccct	tggtttgac	acagaacacc	tatgcctaaa	2400
atacaaaatg	tctcctctag	tgatttggtg	atgctcttgc	gacagagtc	tactccacat	2460
gggctatcct	tatctgatct	ccaagaagcc	aatatgaga	ctttttctga	tgatccatca	2520
cctggagcaa	tagacagtaa	taacagcctg	tctgaaatga	cacacttcag	gccacagctc	2580
catcacagtg	gggacatggt	at ttaccct	gagtcaggcc	tccaattaag	attaaatgag	2640
aaactgggga	caactgcagc	aacagagttg	aagaaacttg	at ttcaaagt	ttctagtaca	2700
tcaataatc	tgatttcaac	aattccatca	gacaatttgg	cagcaggtag	tgataatata	2760
agttccttag	gacccccaag	tatgccagtt	cattatgata	gtcaattaga	taccactcta	2820
tttggcaaaa	agtcactctc	ccttactgag	tctggtggac	ctctgagctt	gagtgaagaa	2880
aataatgatt	caaagtgtt	agaatcaggt	ttaatgaata	gccaagaaag	ttcatgggga	2940
aaaaatgtat	cgtaacaga	gagtggtagg	ttatttaaa	ggaaaagagc	tcattggacct	3000
gctttgttga	ctaaagataa	tgctttattc	aaagttagca	tctctttgtt	aaagacaaac	3060
aaaacttcca	ataattcagc	aactaataga	aagactcaca	ttgatggccc	atcattatta	3120
attgagaata	gtccatcagt	ctggcaaaat	atattagaaa	gtgacactga	gtttaaaaaa	3180
gtgacacctt	tgattcatga	cagaatgctt	atggacaaaa	atgctacagc	tttgaggcta	3240
aatcatatgt	caaataaaac	tacttcatca	aaaaacatgg	aatgggtcca	acagaaaaaa	3300
gaggggccca	ttccaccaga	tgacaaaaat	ccagatatgt	cgttctttaa	gatgctattc	3360
ttgccagaat	cagcaaggtg	gatacaaagg	actcatggaa	agaactctct	gaactctggg	3420
caaggcccca	gtccaaagca	attagtatcc	ttaggaccag	aaaaatctgt	ggaaggtcag	3480
aatttcttgt	ctgagaaaaa	caaagtggta	gtaggaaagg	gtgaatttac	aaaggacgta	3540
ggactcaaag	agatggtttt	tccaagcagc	agaaacctat	ttcttactaa	cttggataat	3600

ttacatgaaa ataatacaca caatcaagaa aaaaaaattc aggaagaaat agaaaagaag	3660
gaaacattaa tccaagagaa tgtagttttg cctcagatac atacagtgaac tggcactaag	3720
aatttcatga agaacctttt cttactgagc actaggcaaa atgtagaagg ttcatatgac	3780
ggggcatatg ctccagtact tcaagatttt aggtcattaa atgattcaac aaatagaaca	3840
aagaaacaca cagctcattt ctcaaaaaaa ggggaggaag aaaacttgga aggcttggga	3900
aatcaaacca agcaaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatatc tcctaataca	3960
agccagcaga attttgtcac gcaacgtagt aagagagctt tgaaacaatt cagactccca	4020
ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acacctcaac ccagtgggcc	4080
aaaaacatga aacatttgac cccgagcacc ctcacacaga tagactacaa tgagaaggag	4140
aaaggggcca ttactcagtc tcccttatca gattgcctta cgaggagtca tagcatccct	4200
caagcaaata gatctccatt acccattgca aaggtatcat catttccatc tattagacct	4260
atatatctga ccagggtcct attccaagac aactcttctc atcttccagc agcatcttat	4320
agaaagaaag attctggggg ccaagaaagc agtcatttct tacaaggagc caaaaaaat	4380
aacctttctt tagccattct aaccttgag atgactggtg atcaaagaga ggttggctcc	4440
ctggggacaa gtgccacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctccc	4500
aaaccagact tgcccaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaaagt tcacatttat	4560
cagaaggacc tattccctac ggaaactagc aatgggtctc ctggccatct ggatctcgtg	4620
gaagggagcc ttcttcaggg aacagaggga gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct	4680
ggaaaagtgc cttttctgag agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta	4740
ttggtacctc ttgcttggga taaccactat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa	4800
tccaagaga agtcaccaga aaaaacagct tttaagaaaa aggataccat tttgtccctg	4860
aacgcttggtg aaagcaatca tgcaatagca gcaataaatg agggacaaaa taagcccga	4920
atagaagtca cctgggcaaa gcaaggtagg actgaaaggc tgtgctctca aaaccacca	4980
gtcttgaaac gccatcaacg ggaaataact cgtactactc ttcagtcaga tcaagaggaa	5040
attgactatg atgataccat atcagttgaa atgaagaagg aagattttga catttatgat	5100
gaggatgaaa atcagagccc ccgcagcttt caaaagaaaa cagcacta ttttattgct	5160
gcagtggaga ggctctggga ttatgggatg agtagctccc cacatgttct aagaaacagg	5220
gtcagagtg gcaagtgtcc tcagttcaag aaagtgttt tccaggaatt tactgatggc	5280
tcctttactc agcccttata ccgtggagaa ctaaatgaac atttgggact cctggggcca	5340
tatataagag cagaagttga agataatat atggttaact tcagaaatca ggcctctcgt	5400
ccctattcct tctattctag ccttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa	5460
cctagaaaaa actttgtcaa gcctaataa accaaaactt acttttgaa agtgcaacat	5520
catatggcac ccactaaaga tgagtttgac tgcaaaacct gggcttattt ctctgatgtt	5580
gacctggaaa aagatgtgca ctcaggcctg attggacccc ttctggtctg ccacactaac	5640

ES 2 654 336 T3

```

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

```

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

5

<400> 15

```

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

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

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

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

```

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

325										330					335				
Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp	Leu	Thr	Asp				
			340					345					350						
Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Phe				
		355					360					365							
Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	Trp	Val	His				
	370					375					380								
Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	Leu	Val	Leu				
385					390					395					400				
Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	Gly	Pro				
				405					410					415					
Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met	Ala	Tyr	Thr				
			420					425					430						
Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	Ser	Gly	Ile				
		435					440					445							
Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile				
	450					455					460								
Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	His	Gly	Ile				
465					470					475					480				
Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	Val	Lys				
				485					490					495					
His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Tyr	Lys				
			500					505					510						
Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys				
		515					520					525							
Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala				
	530					535					540								
Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp				
545					550					555					560				
Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Leu	Phe				
				565					570					575					
Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn	Ile	Gln				
			580					585					590						
Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Phe				

ES 2 654 336 T3

595	600	605
Gln Ala Ser Asn Ile Met	His Ser Ile Asn Gly Tyr Val	Phe Asp Ser
610	615	620
Leu Gln Leu Ser Val Cys	Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile	Leu
625	630	635
Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe	Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr	
	645	650
Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr	Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro	
	660	665
Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met	Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp	
	675	680
Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg	Gly Met Thr Ala	
	695	700
Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr	Gly Asp Tyr Tyr Glu	
	710	715
Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr	Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala	
	725	730
Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Arg	Ser Thr Arg	
	740	745
Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp	Ile Glu Lys	
	755	760
Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro	Lys Ile Gln Asn	
	770	775
Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr	Pro	
	785	790
His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr	Phe	
	805	810
Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser	Leu Ser	
	820	825
Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser	Gly Asp Met Val	
	835	840
Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn	Glu Lys Leu Gly	
	850	855
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 885	Ile Ser Thr Ile	Pro Ser Asp Asn Leu 890	Ala Ala 895
Gly Thr Asp Asn 900	Thr Ser Ser Leu	Gly 905 Pro Pro Ser Met	Pro Val His 910
Tyr Asp Ser 915	Gln Leu Asp Thr	Thr 920 Leu Phe Gly Lys	Lys 925 Ser Ser Pro
Leu Thr 930	Glu Ser Gly Gly	Pro 935 Leu Ser Leu Ser	Glu Glu Asn Asn Asp 940
Ser Lys 945	Leu Leu Glu	Ser 950 Gly Leu Met Asn	Ser 955 Gln Glu Ser Ser Trp 960
Gly Lys Asn Val	Ser 965 Ser Thr Glu	Ser 970 Gly Arg Leu Phe	Lys 975 Gly Lys
Arg Ala His	Gly 980 Pro Ala Leu Leu	Thr 985 Lys Asp Asn Ala	Leu Phe Lys 990
Val Ser	Ile 995 Ser Leu Leu Lys	Thr 1000 Asn Lys Thr Ser	Asn 1005 Asn Ser Ala
Thr Asn 1010	Arg Lys Thr His	Ile 1015 Asp Gly Pro Ser	Leu 1020 Leu Ile Glu
Asn Ser 1025	Pro Ser Val Trp	Gln 1030 Asn Ile Leu Glu	Ser 1035 Asp Thr Glu
Phe Lys 1040	Lys Val Thr Pro	Leu 1045 Ile His Asp Arg	Met 1050 Leu Met Asp
Lys Asn 1055	Ala Thr Ala Leu	Arg 1060 Leu Asn His Met	Ser 1065 Asn Lys Thr
Thr Ser 1070	Ser Lys Asn Met	Glu 1075 Met Val Gln Gln	Lys 1080 Lys Glu Gly
Pro Ile 1085	Pro Pro Asp Ala	Gln 1090 Asn Pro Asp Met	Ser 1095 Phe Phe Lys
Met Leu 1100	Phe Leu Pro Glu	Ser 1105 Ala Arg Trp Ile	Gln 1110 Arg Thr His
Gly Lys 1115	Asn Ser Leu Asn	Ser 1120 Gly Gln Gly Pro	Ser 1125 Pro Lys Gln
Leu Val	Ser Leu Gly Pro Glu	Lys Ser Val Glu Gly	Gln Asn Phe

ES 2 654 336 T3

1130	1135	1140
Leu Ser 1145	Glu Lys Asn Lys Val 1150	Val Val Gly Lys Gly 1155 Glu Phe Thr
Lys Asp 1160	Val Gly Leu Lys Glu 1165	Met Val Phe Pro Ser 1170 Ser Arg Asn
Leu Phe 1175	Leu Thr Asn Leu Asp 1180	Asn Leu His Glu Asn 1185 Asn Thr His
Asn Gln 1190	Glu Lys Lys Ile Gln 1195	Glu Glu Ile Glu Lys 1200 Lys Glu Thr
Leu Ile 1205	Gln Glu Asn Val Val 1210	Leu Pro Gln Ile His 1215 Thr Val Thr
Gly Thr 1220	Lys Asn Phe Met Lys 1225	Asn Leu Phe Leu Leu 1230 Ser Thr Arg
Gln Asn 1235	Val Glu Gly Ser Tyr 1240	Asp Gly Ala Tyr Ala 1245 Pro Val Leu
Gln Asp 1250	Phe Arg Ser Leu Asn 1255	Asp Ser Thr Asn Arg 1260 Thr Lys Lys
His Thr 1265	Ala His Phe Ser Lys 1270	Lys Gly Glu Glu Glu 1275 Asn Leu Glu
Gly Leu 1280	Gly Asn Gln Thr Lys 1285	Gln Ile Val Glu Lys 1290 Tyr Ala Cys
Thr Thr 1295	Arg Ile Ser Pro Asn 1300	Thr Ser Gln Gln Asn 1305 Phe Val Thr
Gln Arg 1310	Ser Lys Arg Ala Leu 1315	Lys Gln Phe Arg Leu 1320 Pro Leu Glu
Glu Thr 1325	Glu Leu Glu Lys Arg 1330	Ile Ile Val Asp Asp 1335 Thr Ser Thr
Gln Trp 1340	Ser Lys Asn Met Lys 1345	His Leu Thr Pro Ser 1350 Thr Leu Thr
Gln Ile 1355	Asp Tyr Asn Glu Lys 1360	Glu Lys Gly Ala Ile 1365 Thr Gln Ser
Pro Leu 1370	Ser Asp Cys Leu Thr 1375	Arg Ser His Ser Ile 1380 Pro Gln Ala
Asn Arg	Ser Pro Leu Pro Ile	Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

1640	1645	1650
Thr Leu 1655	Gln Ser Asp Gln Glu 1660	Glu Ile Asp Tyr Asp 1665
Asp Thr Ile		
Ser Val 1670	Glu Met Lys Lys Glu 1675	Asp Phe Asp Ile Tyr 1680
Asp Glu Asp		
Glu Asn 1685	Gln Ser Pro Arg Ser 1690	Phe Gln Lys Lys Thr 1695
Arg His Tyr		
Phe Ile 1700	Ala Ala Val Glu Arg 1705	Leu Trp Asp Tyr Gly 1710
Met Ser Ser		
Ser Pro 1715	His Val Leu Arg Asn 1720	Arg Ala Gln Ser Gly 1725
Ser Val Pro		
Gln Phe 1730	Lys Lys Val Val Phe 1735	Gln Glu Phe Thr Asp 1740
Gly Ser Phe		
Thr Gln 1745	Pro Leu Tyr Arg Gly 1750	Glu Leu Asn Glu His 1755
Leu Gly Leu		
Leu Gly 1760	Pro Tyr Ile Arg Ala 1765	Glu Val Glu Asp Asn 1770
Ile Met Val		
Thr Phe 1775	Arg Asn Gln Ala Ser 1780	Arg Pro Tyr Ser Phe 1785
Tyr Ser Ser		
Leu Ile 1790	Ser Tyr Glu Glu Asp 1795	Gln Arg Gln Gly Ala 1800
Glu Pro Arg		
Lys Asn 1805	Phe Val Lys Pro Asn 1810	Glu Thr Lys Thr Tyr 1815
Phe Trp Lys		
Val Gln 1820	His His Met Ala Pro 1825	Thr Lys Asp Glu Phe 1830
Asp Cys Lys		
Ala Trp 1835	Ala Tyr Phe Ser Asp 1840	Val Asp Leu Glu Lys 1845
Asp Val His		
Ser Gly 1850	Leu Ile Gly Pro Leu 1855	Leu Val Cys His Thr 1860
Asn Thr Leu		
Asn Pro 1865	Ala His Gly Arg Gln 1870	Val Thr Val Gln Glu 1875
Phe Ala Leu		
Phe Phe 1880	Thr Ile Phe Asp Glu 1885	Thr Lys Ser Trp Tyr 1890
Phe Thr Glu		
Asn Met	Glu Arg Asn Cys Arg	Ala Pro Cys Asn Ile
Gln Met Glu		

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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
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> 16
 <211> 585
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 16

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 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

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

5

<220>
 <223> Cebador

<400> 17
 ttcgaattcc cgcagccctc attgcaggg 30

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

 <220>
 < 223> Cebador

 <400> 18
 10 tccgaattcc ggcagcagca ggcacccatg c 31

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

 15 <220>
 < 223> Cebador

 <400> 19
 gcggcggccg cgagcccat ttccc 25

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

 <220>
 < 223> Cebador

 25 <400> 20
 gagagggagt actcaccc 18

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

 <220>
 < 223> Cebador

 <400> 21
 ggaagtgcag caagtcgagc gggggat 27

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

 <220>
 40 < 223> Cebador

 <400> 22
 atccccgct cgacttgctg cacttcc 27

ES 2 654 336 T3

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

5 <400> 23

```

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

```

ES 2 654 336 T3

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495

ES 2 654 336 T3

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

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

5

<400> 24

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

Ala	Gln	Val	Thr	Val	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Val	Ser	Thr	Leu
	1475					1480					1485			
Gly	Pro	Lys	Arg	Asn	Ser	Met	Val	Leu	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Leu
	1490					1495					1500			
Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Ile	Gly	Glu	Ala	Asp	Phe	Asn	Arg	Ser	Lys
	1505					1510					1515			
Glu	Phe	Met	Glu	Glu	Val	Ile	Gln	Arg	Met	Asp	Val	Gly	Gln	Asp
	1520					1525					1530			
Ser	Ile	His	Val	Thr	Val	Leu	Gln	Tyr	Ser	Tyr	Met	Val	Thr	Val
	1535					1540					1545			
Glu	Tyr	Pro	Phe	Ser	Glu	Ala	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Leu	Gln
	1550					1555					1560			
Arg	Val	Arg	Glu	Ile	Arg	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Arg	Thr	Asn	Thr
	1565					1570					1575			
Gly	Leu	Ala	Leu	Arg	Tyr	Leu	Ser	Asp	His	Ser	Phe	Leu	Val	Ser
	1580					1585					1590			
Gln	Gly	Asp	Arg	Glu	Gln	Ala	Pro	Asn	Leu	Val	Tyr	Met	Val	Thr
	1595					1600					1605			
Gly	Asn	Pro	Ala	Ser	Asp	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Pro	Gly	Asp	Ile
	1610					1615					1620			
Gln	Val	Val	Pro	Ile	Gly	Val	Gly	Pro	Asn	Ala	Asn	Val	Gln	Glu
	1625					1630					1635			
Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	Trp	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ile	Gln	Asp
	1640					1645					1650			
Phe	Glu	Thr	Leu	Pro	Arg	Glu	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Gln	Arg
	1655					1660					1665			
Cys	Cys	Ser	Gly	Glu	Gly	Leu	Gln	Ile	Pro	Thr	Leu	Ser	Pro	Ala
	1670					1675					1680			
Pro	Asp	Cys	Ser	Gln	Pro	Leu	Asp	Val	Ile	Leu	Leu	Leu	Asp	Gly
	1685					1690					1695			
Ser	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	Ser	Tyr	Phe	Asp	Glu	Met	Lys	Ser	Phe
	1700					1705					1710			
Ala	Lys	Ala	Phe	Ile	Ser	Lys	Ala	Asn	Ile	Gly	Pro	Arg	Leu	Thr
	1715					1720					1725			

ES 2 654 336 T3

Gln Val 1730	Ser Val	Leu Gln	Tyr 1735	Gly Ser	Ile Thr	Thr 1740	Ile Asp	Val
Pro Trp 1745	Asn Val	Val Pro	Glu 1750	Lys Ala	His Leu	Leu 1755	Ser Leu	Val
Asp Val 1760	Met Gln	Arg Glu	Gly 1765	Gly Pro	Ser Gln	Ile 1770	Gly Asp	Ala
Leu Gly 1775	Phe Ala	Val Arg	Tyr 1780	Leu Thr	Ser Glu	Met 1785	His Gly	Ala
Arg Pro 1790	Gly Ala	Ser Lys	Ala 1795	Val Val	Ile Leu	Val 1800	Thr Asp	Val
Ser Val 1805	Asp Ser	Val Asp	Ala 1810	Ala Ala	Asp Ala	Ala 1815	Arg Ser	Asn
Arg Val 1820	Thr Val	Phe Pro	Ile 1825	Gly Ile	Gly Asp	Arg 1830	Tyr Asp	Ala
Ala Gln 1835	Leu Arg	Ile Leu	Ala 1840	Gly Pro	Ala Gly	Asp 1845	Ser Asn	Val
Val Lys 1850	Leu Gln	Arg Ile	Glu 1855	Asp Leu	Pro Thr	Met 1860	Val Thr	Leu
Gly Asn 1865	Ser Phe	Leu His	Lys 1870	Leu Cys	Ser Gly	Phe 1875	Val Arg	Ile
Cys Met 1880	Asp Glu	Asp Gly	Asn 1885	Glu Lys	Arg Pro	Gly 1890	Asp Val	Trp
Thr Leu 1895	Pro Asp	Gln Cys	His 1900	Thr Val	Thr Cys	Gln 1905	Pro Asp	Gly
Gln Thr 1910	Leu Leu	Lys Ser	His 1915	Arg Val	Asn Cys	Asp 1920	Arg Gly	Leu
Arg Pro 1925	Ser Cys	Pro Asn	Ser 1930	Gln Ser	Pro Val	Lys 1935	Val Glu	Glu
Thr Cys 1940	Gly Cys	Arg Trp	Thr 1945	Cys Pro	Cys Val	Cys 1950	Thr Gly	Ser
Ser Thr 1955	Arg His	Ile Val	Thr 1960	Phe Asp	Gly Gln	Asn 1965	Phe Lys	Leu
Thr Gly 1970	Ser Cys	Ser Tyr	Val 1975	Leu Phe	Gln Asn	Lys 1980	Glu Gln	Asp

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

Cys 2495	Leu	Pro	Ser	Ala	Cys	Glu 2500	Val	Val	Thr	Gly	Ser 2505	Pro	Arg	Gly
Asp 2510	Ser	Gln	Ser	Ser	Trp	Lys 2515	Ser	Val	Gly	Ser	Gln 2520	Trp	Ala	Ser
Pro 2525	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile 2530	Asn	Glu	Cys	Val	Arg 2535	Val	Lys	Glu
Glu 2540	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg 2545	Asn	Val	Ser	Cys	Pro 2550	Gln	Leu	Glu
Val 2555	Pro	Val	Cys	Pro	Ser	Gly 2560	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys 2565	Lys	Thr	Ser
Ala 2570	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg 2575	Cys	Glu	Arg	Met	Glu 2580	Ala	Cys	Met
Leu 2585	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly 2590	Pro	Gly	Lys	Thr	Val 2595	Met	Ile	Asp
Val 2600	Cys	Thr	Thr	Cys	Arg	Cys 2605	Met	Val	Gln	Val	Gly 2610	Val	Ile	Ser
Gly 2615	Phe	Lys	Leu	Glu	Cys	Arg 2620	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn 2625	Pro	Cys	Pro
Leu 2630	Gly	Tyr	Lys	Glu	Glu	Asn 2635	Asn	Thr	Gly	Glu	Cys 2640	Cys	Gly	Arg
Cys 2645	Leu	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr 2650	Ile	Gln	Leu	Arg	Gly 2655	Gly	Gln	Ile
Met 2660	Thr	Leu	Lys	Arg	Asp	Glu 2665	Thr	Leu	Gln	Asp	Gly 2670	Cys	Asp	Thr
His 2675	Phe	Cys	Lys	Val	Asn	Glu 2680	Arg	Gly	Glu	Tyr	Phe 2685	Trp	Glu	Lys
Arg 2690	Val	Thr	Gly	Cys	Pro	Pro 2695	Phe	Asp	Glu	His	Lys 2700	Cys	Leu	Ala
Glu 2705	Gly	Gly	Lys	Ile	Met	Lys 2710	Ile	Pro	Gly	Thr	Cys 2715	Cys	Asp	Thr
Cys 2720	Glu	Glu	Pro	Glu	Cys	Asn 2725	Asp	Ile	Thr	Ala	Arg 2730	Leu	Gln	Tyr
Val 2735	Lys	Val	Gly	Ser	Cys	Lys 2740	Ser	Glu	Val	Glu	Val 2745	Asp	Ile	His

ES 2 654 336 T3

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

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

5

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

<400> 25

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

10

ES 2 654 336 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

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

ES 2 654 336 T3

Ile	Asn	Asp	Val	Gln	Asp	Gln	Cys	Ser	Cys	Cys	Ser	Pro	Thr	Arg
	2765					2770					2775			
Thr	Glu	Pro	Met	Gln	Val	Ala	Leu	His	Cys	Thr	Asn	Gly	Ser	Val
	2780					2785					2790			
Val	Tyr	His	Glu	Val	Leu	Asn	Ala	Met	Glu	Cys	Lys	Cys	Ser	Pro
	2795					2800					2805			
Arg	Lys	Cys	Ser	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	2810					2815					2820			
Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	2825					2830					2835			
Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His
	2840					2845					2850			
Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu
	2855					2860					2865			
Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His
	2870					2875					2880			
Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val
	2885					2890					2895			
Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu
	2900					2905					2910			
Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr
	2915					2920					2925			
Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn
	2930					2935					2940			
Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg
	2945					2950					2955			
Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp
	2960					2965					2970			
Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg
	2975					2980					2985			
Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys
	2990					2995					3000			
Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys
	3005					3010					3015			

ES 2 654 336 T3

Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly
	3020					3025					3030			
Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln
	3035					3040					3045			
Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu
	3050					3055					3060			
Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu
	3065					3070					3075			
Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp
	3080					3085					3090			
Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile
	3095					3100					3105			
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys
	3110					3115					3120			
Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu
	3125					3130					3135			
Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe
	3140					3145					3150			
Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp
	3155					3160					3165			
Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro
	3170					3175					3180			
Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu
	3185					3190					3195			
Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys
	3200					3205					3210			
Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro
	3215					3220					3225			
Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly
	3230					3235					3240			
Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys
	3245					3250					3255			
Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn
	3260					3265					3270			

ES 2 654 336 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un factor VIII modificado o un complejo que comprende factor VIII modificado y VWF no modificado, donde el factor VIII modificado está fusionado en una parte C-terminal del polipéptido de traducción primario del factor VIII con la parte N-terminal de una albúmina.
- 5 2. Un factor VIII modificado o un complejo que comprende factor VIII modificado y VWF no modificado de acuerdo con la reivindicación 1, donde
 - a. el factor VIII modificado presenta una semivida funcional prolongada en comparación con la semivida funcional del factor VIII de origen natural o
 - 10 b. el complejo que comprende factor VIII modificado y VWF no modificado presenta una semivida funcional prolongada en comparación con la semivida funcional del complejo correspondiente que comprende factor VIII de origen natural y VWF de origen natural.
- 15 3. Un factor VIII modificado o un complejo que comprende dicho factor VIII modificado o un complejo que comprende factor VIII modificado y VWF no modificado de acuerdo con la reivindicación 2, donde el factor VIII modificado presenta un incremento de la semivida funcional de al menos un 25% en comparación con la semivida funcional del factor VIII correspondiente de origen natural o un complejo que comprende dicho factor VIII modificado y VWF no modificado presenta un incremento de la semivida funcional de al menos un 25% en comparación con el complejo correspondiente de FVIII de origen natural y VWF de origen natural.
- 20 4. Un factor VIII modificado o un complejo que comprende factor VIII modificado y VWF no modificado de acuerdo con la reivindicación 1, donde
 - a. el factor VIII modificado presenta una semivida del antígeno prolongada en comparación con la semivida del antígeno del factor VIII de origen natural o
 - b. el complejo que comprende factor VIII modificado y VWF no modificado presenta una semivida del antígeno prolongada en comparación con la semivida del antígeno del complejo correspondiente que comprende factor VIII de origen natural y VWF de origen natural.
- 25 5. Un factor VIII modificado o un complejo que comprende factor VIII modificado y VWF no modificado de acuerdo con la reivindicación 4, donde el factor VIII modificado presenta un incremento de la semivida del antígeno de al menos un 25% en comparación con la semivida del antígeno del factor VIII correspondiente de origen natural o un complejo que comprende dicho factor VIII modificado y VWF no modificado presenta un incremento de la semivida del antígeno de al menos un 25% en comparación con el complejo correspondiente de FVIII de origen natural y VWF de origen natural.
- 30 6. Un factor VIII modificado o un complejo que comprende FVIII modificado y VWF no modificado de acuerdo con la reivindicación 1, donde
 - a. el factor VIII modificado presenta un incremento de la recuperación *in vivo* en comparación con la recuperación *in vivo* del factor VIII de origen natural o
 - 35 b. el complejo que comprende el factor VIII modificado y VWF no modificado presenta un incremento de la recuperación *in vivo* en comparación con la recuperación *in vivo* del complejo correspondiente que comprende factor VIII de origen natural y VWF de origen natural.
- 40 7. Un factor VIII modificado o un complejo que comprende factor VIII modificado y VWF no modificado de acuerdo con la reivindicación 6, donde el factor VIII modificado presenta un incremento de la recuperación *in vivo* de al menos un 10% en comparación con la recuperación *in vivo* del correspondiente factor VIII de origen natural o un complejo que comprende dicho factor VIII modificado y VWF no modificado presenta un incremento de la recuperación *in vivo* de al menos un 10% en comparación con el complejo correspondiente del factor VIII de origen natural y VWF de origen natural.
- 45 8. Un factor VIII modificado o un complejo que comprende factor VIII modificado y VWF no modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el factor VIII modificado presenta al menos un 10% de la actividad biológica del factor VIII de origen natural o el complejo que comprende el polipéptido modificado o un complejo que comprende dichos polipéptidos modificados presenta al menos un 10% de la actividad biológica del complejo correspondiente de FVIII de origen natural y VWF de origen natural.
- 50 9. Un FVIII modificado recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho FVIII modificado recombinante se secreta a partir de células de mamífero con un rendimiento más elevado que el FVIII de origen natural.

10. Un polinucleótido o un grupo de polinucleótidos, que codifican un factor VIII modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
11. Un plásmido o vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 10, siendo dicho plásmido o vector un vector de expresión o un vector de transferencia para su uso en terapia génica humana.
- 5 12. Una célula huésped que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 10 o un plásmido o vector de acuerdo con la reivindicación 11.
13. Un método para producir un factor VIII modificado, que comprende:
- (a) cultivar células huésped de acuerdo con la reivindicación 12 en condiciones en las que se exprese el factor VIII modificado; y
- 10 (b) opcionalmente recuperar el factor VIII modificado de las células huésped o del medio de cultivo.
14. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o un complejo que comprende dicho factor VIII modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 10, o un plásmido o vector de acuerdo con la reivindicación 11.
- 15 15. El uso de un polipéptido o un complejo que comprende dicho factor VII modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 10, o un plásmido o vector de acuerdo con la reivindicación 11, o de una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 12 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno de coagulación de la sangre.
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, donde el trastorno de coagulación de la sangre es la hemofilia A.
17. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 15, donde el tratamiento comprende terapia génica humana.

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

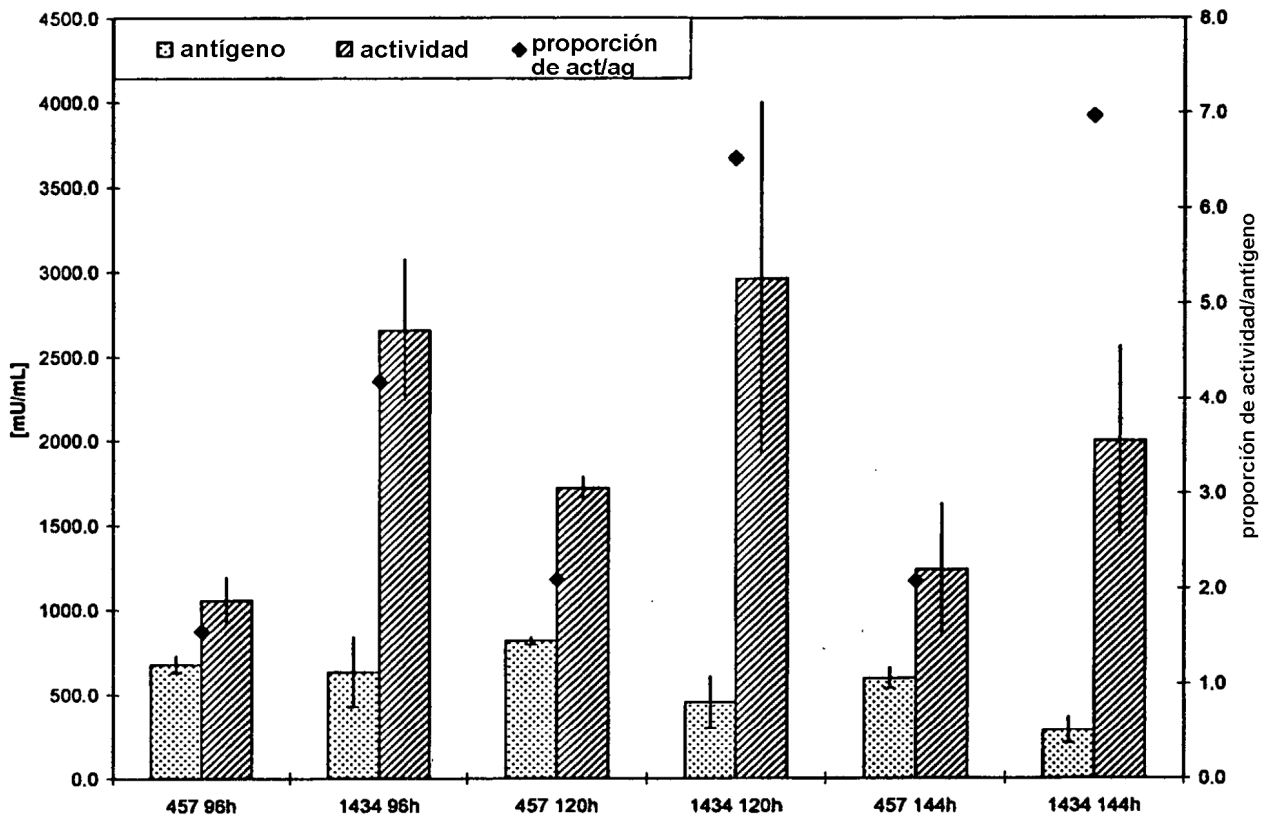


Figura 2: Comparación de los parámetros farmacocinéticos de FVIII humano: Ag en ratones con supresión de VWF tras la inyección i.v. de 100 U (FVIII:Ag)/kg de FVIII de origen natural y FVIII-FP 1656 VWF (media; n=4/punto de evaluación)

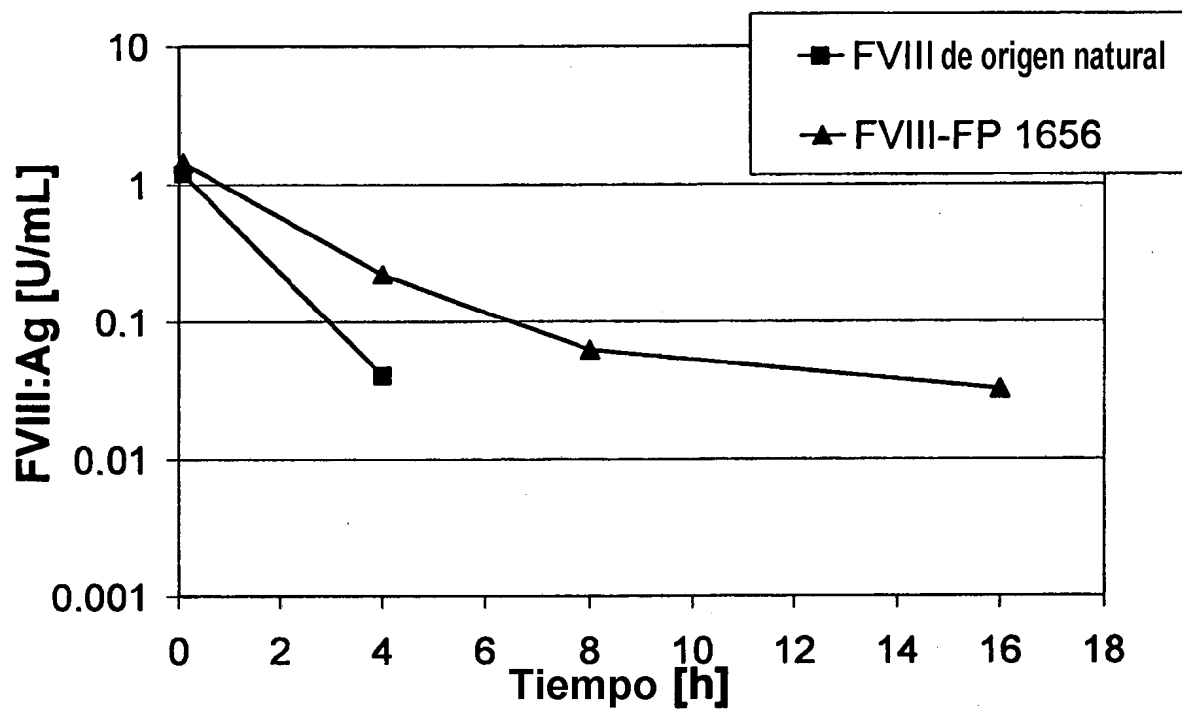


Figura 3: Proporciones de VWF:RCo/VWF:Ag de sobrenadantes de cultivos celulares que contienen rVWF de origen natural (1570/797), rVWF-FP (1572/797) que contiene albúmina unida al extremo C-terminal, o un cultivo celular de expresión mixta que contiene una mezcla de rVWF de origen natural (1570/797) y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

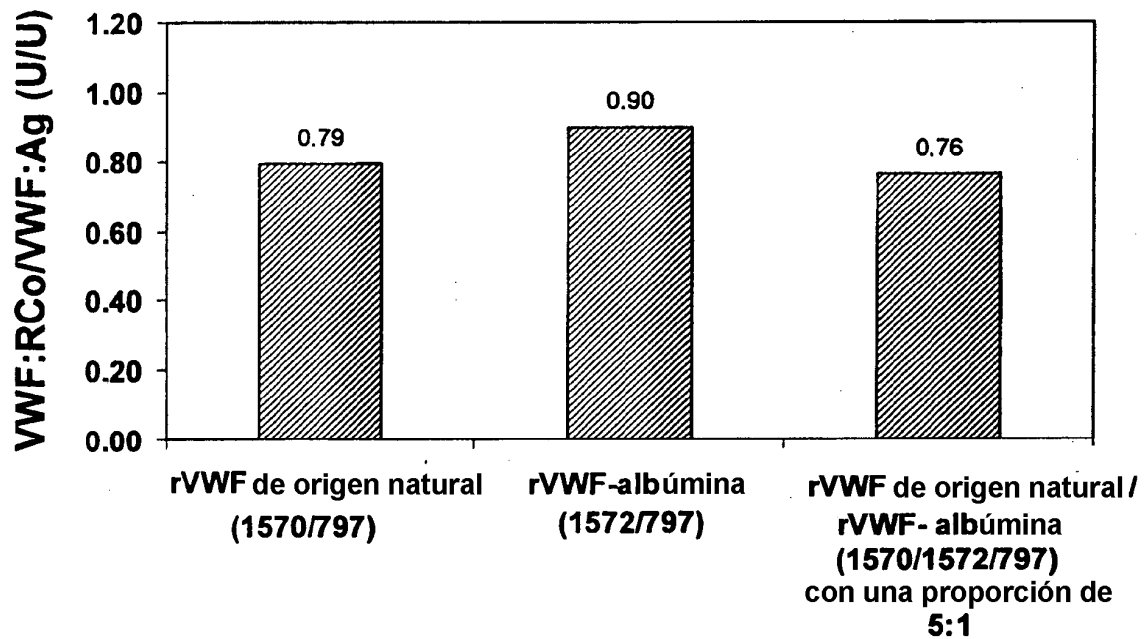
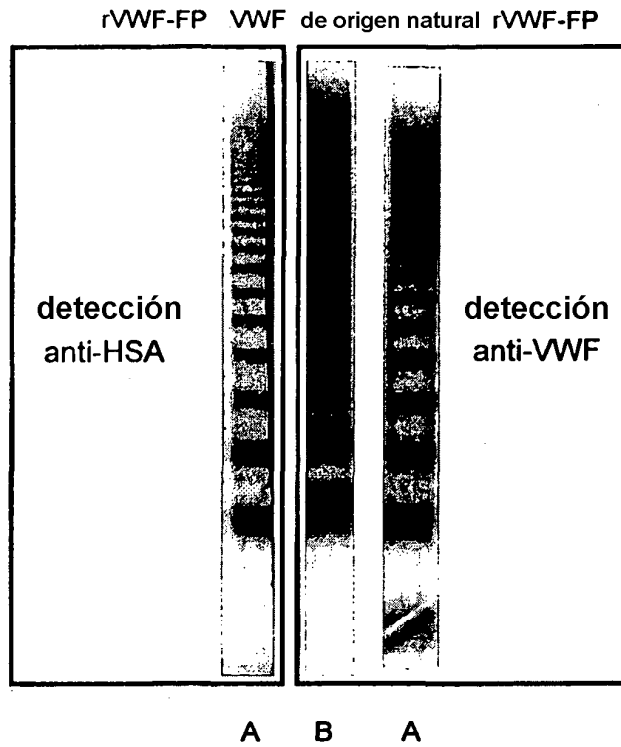


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa-SDS de rVWF de origen natural (1570/797) (B) y rVWF-FP (1572/797), ambos expresados en células HEK (A). Las bandas se detectaron utilizando o bien anticuerpos para VWF o para albúmina (ASH).



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

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

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

