

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 291**

51 Int. Cl.:

A61K 38/37 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2013** **E 13164728 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017** **EP 2796145**

54 Título: **Un complejo covalente de factor de von Willebrand y factor VIII asociado por un puente disulfuro**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2018

73 Titular/es:

CSL LTD. (100.0%)
45 Poplar Road
Parkville VIC 3052, AU

72 Inventor/es:

WEIMER, THOMAS;
METZNER, HUBERT y
SCHULTE, STEFAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 657 291 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

Un complejo covalente de factor de von Willebrand y factor VIII asociado por un puente disulfuro

La presente invención se refiere a un complejo covalente de factor de von Willebrand (VWF) y factor VIII, en el que el complejo se modifica de forma que tenga una semivida *in vivo* prolongada. La invención se refiere además a un método de producción del complejo, además del uso terapéutico o profiláctico del complejo para tratar o prevenir eventos de hemorragia.

Hay diversos trastornos de hemorragia producidos por deficiencias de factores de coagulación de la sangre. Los trastornos más comunes son hemofilia A y B, resultantes de deficiencias del factor de coagulación de la sangre VIII y IX, respectivamente. Otro trastorno de hemorragia conocido es la enfermedad de von Willebrand.

En el plasma, el factor VIII (FVIII) existe principalmente como un complejo no covalente con factor de von Willebrand (VWF). El FVIII maduro, un polipéptido de hasta 2332 aminoácidos después de la escisión de pro-péptidos, está compuesto por varios dominios como se representa en la Figura 1. La función de FVIII en la coagulación es acelerar la conversión dependiente de factor IXa del factor X en Xa. Debido a la formación de complejos de FVIII y VWF, se supuso durante un largo tiempo que las funciones de FVIII y VWF son dos funciones de la misma molécula. Solo en los años 70 fue evidente que FVIII y VWF son moléculas separadas que forman un complejo en condiciones fisiológicas. En los años 80, se determinó una constante de disociación de FVIII y VWF de aproximadamente 0,2 nmol/l (Leyte et al., *Biochem J* 1989, 257: 679-683) y se determinó la secuencia de ADN de ambas moléculas.

La hemofilia clásica o hemofilia A es un trastorno hemorrágico heredado. Resulta de una deficiencia asociada al cromosoma X de FVIII de la coagulación de la sangre, y afecta casi exclusivamente a los hombres con una incidencia de entre uno y dos individuos por cada 10.000. El defecto del cromosoma X se transmite por portadoras femeninas que no son ellas mismas hemofílicas. La manifestación clínica de la hemofilia A es una tendencia hemorrágica en aumento. Antes de la introducción del tratamiento con concentrados de FVIII, la esperanza de vida media para una persona con hemofilia severa era inferior a 20 años. El uso de concentrados de FVIII de plasma ha mejorado considerablemente la situación para los pacientes con hemofilia A, aumentando ampliamente la esperanza de vida media, proporcionando a la mayoría de ellos la posibilidad de vivir una vida más o menos normal. Sin embargo, ha habido ciertos problemas con los concentrados derivados de plasma y su uso, habiendo sido el más grave la transmisión de virus tales como virus que causan hepatitis B, hepatitis no A no B y VIH. Sin embargo, recientemente se han desarrollado diferentes métodos de inactivación de virus y nuevos concentrados de FVIII altamente purificados que establecieron un patrón de seguridad muy alto para FVIII derivado de plasma.

En los pacientes con hemofilia A severa que reciben tratamiento profiláctico, FVIII tiene que administrarse por vía intravenosa (i.v.) aproximadamente 3 veces por semana debido a la corta semivida en plasma de FVIII de aproximadamente 12 horas. Cada administración i.v. es engorrosa, asociada a dolor, e implica el riesgo de una infección, especialmente ya que esto se hace principalmente en casa por los propios pacientes o por los padres de los niños diagnosticados con hemofilia A.

Así, sería altamente deseable crear un FVIII con elevada semivida funcional que permitiera la fabricación de las composiciones farmacéuticas que contienen FVIII, que tuviera que administrarse menos frecuentemente.

Se han hecho varios intentos por prolongar la semivida funcional de FVIII, ya sea reduciendo su interacción con los receptores celulares (documentos WO 03/093313A2, WO 02/060951A2), por unión covalente de polímeros a FVIII (documentos WO 94/15625, WO 97/11957 y US 4970300), por encapsulación de FVIII (documento WO 99/55306), por la introducción de novedosos sitios de unión a metal (documento WO 97/03193), por la unión covalente del dominio A2 al dominio A3 ya sea por enlace peptídico (documentos WO 97/40145 y WO 03/087355) o disulfuro (documento WO 02/103024A2), o introduciendo mutaciones que previenen la escisión por trombina entre los dominios A1 y A2 y, por tanto, mantienen el dominio A1 covalentemente unido al dominio A2 después de la activación de trombina (documento WO2006/108590).

Otro enfoque para potenciar la semivida funcional de FVIII o VWF es por PEGilación de FVIII (documentos WO 2007/126808, WO 2006/053299, WO 2004/075923) o por PEGilación de VWF (documento WO 2006/071801), con la idea de que VWF pegilado, por tener una elevada semivida, también potenciaría indirectamente la semivida de FVIII presente en el plasma. Además, se han descrito proteínas de fusión de FVIII con polipéptidos potenciadores de la semivida como albúmina o la región constante Fc de inmunoglobulinas (documentos WO 2004/101740, WO2008/077616 y WO 2009/156137).

VWF, que está ausente, es funcionalmente defectuoso o solo disponible en cantidad reducida en diferentes formas de enfermedad de von Willebrand (VWD), es una glucoproteína adhesiva multimérica presente en el plasma de mamíferos, que tiene múltiples funciones fisiológicas. Durante la hemostasia primaria, VWF actúa de mediador entre receptores específicos sobre la superficie de la plaqueta y componentes de la matriz extracelular tales como el colágeno. Además, el VWF sirve de proteína portadora y estabilizadora para FVIII procoagulante. VWF se sintetiza en células endoteliales y megacariocitos como una molécula precursora de 2813 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADNc de VWF no mutado se desvelan en Collins et al. 1987, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 84:4393-4397. El polipéptido precursor, pre-pro-VWF, consiste en un péptido señal de 22 restos, un pro-péptido

de 741 restos y el polipéptido de 2050 restos encontrado en VWF de plasma maduro (Fischer et al., FEBS Lett. 351: 345-348, 1994), véase también la Figura 2 para pro-VWF y unidad de monómero de VWF madura. Después de la escisión del péptido señal en el retículo endoplásmico se forma un puente disulfuro de extremo C entre dos monómeros de VWF. Durante el transporte adicional a través de la vía secretora se añaden 12 cadenas laterales de hidrato de carbono unidas en N y 10 unidas en O. Y, lo que es más importante, los dímeros de VWF se multimerizan mediante puentes disulfuro del extremo N y el pro-péptido de 741 aminoácidos de longitud se escinde por la enzima PACE/furina en el aparato de Golgi tardío. El pro-péptido, además de los multímeros de alto peso molecular de vWF (VWF-HMWM), se almacenan en los cuerpos de Weibel-Pallade de células endoteliales o en los gránulos α de plaquetas.

Una vez secretada en plasma, la proteasa ADAMTS13 escinde multímeros de VWF ultra-grandes dentro del dominio A2 de VWF. VWF del plasma consiste en una gama completa de multímeros que oscilan de dímeros individuales de aprox. 500 kDa a multímeros que consisten en hasta o incluso más de 20 dímeros de un peso molecular de más de 10.000 kDa. VWF-HMWM tiene la actividad hemostática más fuerte, que puede medirse por un ensayo de actividad del cofactor de ristocetina (VWF:RCo). Cuanto más alta sea la relación de antígeno VWF:RCo/VWF, más alta será la cantidad relativa de multímeros de alto peso molecular.

Los defectos en VWF son la causa de enfermedad de von Willebrand (VWD), que se caracteriza por un fenotipo de hemorragia más o menos pronunciado. VWD tipo 3 es la forma más severa en la que VWF está esencialmente completamente ausente, VWD tipo 1 se refiere a un nivel reducido de VWF y su fenotipo puede ser muy leve. VWD tipo 2 se refiere a defectos cualitativos de VWF y puede ser tan severo como VWD tipo 3. VWD tipo 2 tiene muchas sub-formas, estando algunas de ellas asociadas a la pérdida o la disminución de multímeros de alto peso molecular. VWD tipo 2A se caracteriza por una pérdida de tanto multímeros intermedios como grandes, y, por tanto, se caracteriza por VWF cualitativamente defectuoso con una capacidad reducida para unirse al receptor de glucoproteína 1 de plaquetas. VWD tipo 2B se caracteriza por una pérdida de multímeros de peso molecular más alto. La capacidad de VWF cualitativamente defectuoso para unirse al receptor de glucoproteína 1 en la membrana plaquetaria está anormalmente potenciada, conduciendo a su unión espontánea a plaquetas y posterior eliminación de las plaquetas unidas y de los multímeros de VWF grandes. VWD tipo 2M también es un defecto cualitativo en VWF caracterizado por su reducida capacidad para unirse al receptor de glucoproteína 1 en la membrana de la plaqueta, pero una distribución de multímeros normal, como son niveles de antígeno de VWF. VWD tipo 2N (Normandía) es un defecto cualitativo en VWF, donde hay una deficiencia de la unión de VWF al factor de coagulación FVIII. Aunque, la cantidad de VWF y multímeros de VWF es normal, los pacientes muestran un nivel reducido en FVIII, conduciendo a un fenotipo similar como hemofilia A.

VWD es el trastorno de hemorragia más frecuente heredado en seres humanos y puede ser - dependiendo del tipo de VWD - tratado por terapia con 1-desamino-8-D-arginina-vasopresina (DDAVP) para liberar VWF de grupos de almacenamiento intracelular o por terapia de sustitución con concentrados que contienen VWF de origen plasmático o recombinante. VWF puede prepararse a partir de plasma humano como se describe, por ejemplo, en el documento EP 0503991. El documento EP 0784632 describe un método de aislamiento de VWF recombinante.

En plasma, FVIII se une con alta afinidad a VWF, que lo protege del catabolismo prematuro y así desempeña, además de su función en la hemostasia primaria, una función crucial en la regulación de los niveles en plasma de FVIII. Como consecuencia, VWF también es un factor central en el control de la hemostasia secundaria. La semivida de FVIII no activado unido a VWF en plasma es aproximadamente 12 horas. En VWD tipo 3, donde nada o casi nada de VWF está presente, la semivida de FVIII es solo aproximadamente 2 horas, que conduce a síntomas de hemofilia A de leve a moderada en tales pacientes debido a concentraciones reducidas de FVIII.

También se ha usado el efecto estabilizante de VWF sobre FVIII para ayudar en la expresión recombinante de FVIII en células CHO (Kaufman et al. 1989, Mol Cell Biol).

Existe una necesidad de mejores enfoques adicionales para aumentar la semivida de FVIII, y la presente invención proporciona un complejo covalente de VWF y FVIII, en particular usando métodos para aumentar la semivida del componente de VWF en el complejo, que permite la provisión de complejos estables que tienen una semivida prolongada que son ventajosos en terapia y profilaxis de trastornos de hemorragia.

Sumario

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un complejo covalente que comprende factor de von Willebrand (VWF) o variantes del mismo y factor VIII (FVIII) o variantes del mismo, en el que el complejo se modifica de forma que tenga una semivida *in vivo* prolongada. Preferentemente, se modifica para comprender un resto que prolonga la semivida.

En una primera realización, FVIII se modifica de manera que forme un puente disulfuro con VWF. Preferentemente, FVIII se modifica por sustitución de un aminoácido que existe de forma natural con un resto de cisteína o por inserción de un resto de cisteína que forma un puente disulfuro con un resto de cisteína en VWF. Preferentemente, el aminoácido que existe de forma natural que está sustituido en FVIII está seleccionado de un aminoácido en el dominio a3, o un resto de cisteína se inserta en el dominio a3. Más preferentemente, el aminoácido que existe de

forma natural es un resto ácido, preferentemente un resto ácido conservado, o un resto implicado en un fenotipo hemófilo, o un resto de Tyr que puede estar sulfatado en el dominio a3 de FVIII. Incluso más preferentemente, el aminoácido que existe de forma natural en el dominio a3 que está sustituido con cisteína está seleccionado de E1649, D1658, E1660, D1663, Y1664, D1665, D1666, E1671, E1675, D1676, D1678, I1679, Y1680, E1682, D1683, E1684 en SEQ ID NO: 6 o posición equivalente en una forma genéticamente manipulada de FVIII.

En otra realización, un resto de cisteína se inserta en el dominio de extremo C, o el aminoácido que existe de forma natural que está sustituido con cisteína está en el dominio de extremo C de FVIII, preferentemente el resto está seleccionado de I2098, S2119, N2129, R2150, P2153, W2229, Q2246 en SEQ ID NO: 6 o posición equivalente en una forma manipulada de FVIII.

En una realización preferida adicional del primer aspecto de la invención, VWF también se modifica por sustitución de un aminoácido que existe de forma natural con un resto de cisteína o la inserción de un resto de cisteína que forma un puente disulfuro con un resto de cisteína introducido en FVIII. Preferentemente, un resto de cisteína se inserta en la región D' o D3 (véase la Figura 2), o el aminoácido que existe de forma natural en VWF que está sustituido con un resto de cisteína es un resto básico en la región D' o D3 o un resto altamente conservado en la región D' o D3 o un resto implicado en VWD tipo N. Preferentemente, el aminoácido que existe de forma natural en VWF está seleccionado de R768, R782, R816, R820, R826, R852, R854, R906, R924, R945, R960, R976, R1035, H817, H831, H861, H874, H916, H952, H977, H1047, K773, K790, K834, K843, K855, K882, K912, K920, K922, K923, K940, K948, K968, K985, K991, K1026, K1036, K1052, K1073, G785, M800, D879, Q1053, E1078, E787, A789, T789, T791, Q793, N794, Y795, P828, F830, E835, P838, D853, W856, L884 en SEQ ID NO: 2 o posición equivalente en una forma manipulada de VWF.

Más preferentemente, se introducen una o más de las siguientes combinaciones de sustituciones de restos de aminoácidos que existen de forma natural en VWF y FVIII: A/T789C:D1658C, M800C:D1658C, P828C:D1658C, F830C:D1658C, P838C:D1658C, D853C:D1658C, R924C:D1658C, E1078C:D1658C, F830C:D1663C, P838C:D1663C, D853C:D1663C, E1078C:D1663C, E1078C:Y1664C, P838C:D1665C, R816C:D1666C, F830C:D1666C, E835C:D1666C, T791C:E1671C, F830C:E1671C, E835C:E1671C, D879C:E1671C, A/T789C:E1675C, T791C:E1675C, N794C:E1675C, P828C:E1675C, F830C:E1675C, E835C:E1675C, P838C:E1675C, D879C:E1675C, R924C:E1675C, E1078C:E1675C, A/T789C:D1676C, T791C:D1676C, N794C:D1676C, F830C:D1676C, E835C:D1676C, A/T789C:D1678C, F830C:D1678C, E835C:D1678C, A/T789C:I1679C, M800C:I1679C, F830C:I1679C, E835C:I1679C, R854C:I1679C, D879C:I1679C, A/T789C:Y1680C, T791C:Y1680C, Y795C:Y1680C, M800C:Y1680C, R816C:Y1680C, F830C:Y1680C, E835C:Y1680C, R854C:Y1680C, D879C:Y1680C, A/T789C:E1682C, Y795C:E1682C, R816C:E1682C, P828C:E1682C, E835C:E1682C, P838C:E1682C, R854C:E1682C, D879C:E1682C, Q1053C:E1682C.

Preferentemente, el FVIII en el complejo de la invención es un FVIII genéticamente manipulado. El FVIII manipulado puede tener una delección del dominio B parcial o completa, puede ser un FVIII mutado que comprende una o más sustituciones, inserciones, delecciones de aminoácidos, o combinación de las mismas, o puede ser un polipéptido de fusión con un resto que prolonga la semivida o un FVIII químicamente modificado, por ejemplo, modificado por unión de un resto que prolonga la semivida tal como polietilenglicol (PEGilación), PEG glucosilado, hidroxietilalmidón (HESilación), ácidos polisialícos, polipéptidos de tipo elastina, polímeros de heparosán o ácido hialurónico.

En una realización preferida, el VWF en el complejo de la invención es una forma de semivida prolongada de VWF, preferentemente es una forma genéticamente manipulada de VWF. Más preferentemente, el VWF genéticamente manipulado es una proteína de fusión de VWF con un resto que prolonga la semivida. Preferentemente, el resto que prolonga la semivida es un polipéptido que prolonga la semivida (HLEP), más preferentemente HLEP está seleccionado de albúmina o fragmentos de la misma, región constante de inmunoglobulina y porciones de la misma, por ejemplo el fragmento Fc, cadenas al azar solvatadas con volumen hidrodinámico grande (por ejemplo, XTEN (Schellenberger et al. 2009), repeticiones de homo-aminoácidos (HAP) o repeticiones de prolina-alanina-serina (PAS)), afamina, alfa-fetoproteína, proteína de unión a vitamina D, transferrina, polipéptidos o lípidos capaces de unirse en condiciones fisiológicas a albúmina o regiones constantes de inmunoglobulina. En otra realización preferida, el VWF del complejo se expresa como un dímero. En una realización preferida adicional, el VWF del complejo forma multímeros.

En otra realización de la invención, la semivida del complejo de la invención se prolonga por modificación química, por ejemplo, unión de un resto que prolonga la semivida tal como polietilenglicol (PEGilación), PEG glucosilado, hidroxietilalmidón (HESilación), ácidos polisialícos, polipéptido de tipo elastina, polímeros de heparosán o ácido hialurónico.

Una segunda realización de la invención es un complejo covalente que comprende VWF y FVIII, en el que el complejo se modifica de forma que tenga una semivida *in vivo* prolongada, y en el que FVIII se modifica para comprender uno o más dominios de VWF. Preferentemente, la semivida prolongada del complejo se obtiene usando una forma de semivida prolongada de VWF en el complejo.

Preferentemente, el FVIII está fusionado con uno o más de los dominios del extremo C de VWF (véase la Figura 4), preferentemente el uno o más dominios del extremo C de VWF están fusionados con el extremo C de FVIII. Tales

dominios del extremo C de VWF comprenden el dominio de nudo de cistina (CK) del extremo C de VWF y además pueden comprender uno o más dominios adicionales de VWF. Más preferentemente, el FVIII comprende, preferentemente en su extremo C, los restos 2724-2813, 2722-2813, 2578-2813, 2497-2813, 2429-2813, 2400-2813, 2334-2813, 2255-2813, 1873-2813, 1683-2813, 1277-2813 o 764-2813 de SEQ ID NO: 2 o variantes de la misma, a condición de que se preserve el resto de cisteína 2773 (o equivalente del mismo).

Preferentemente, el dominio CK del extremo C de VWF, que opcionalmente comprende adicionalmente dominios de VWF como se desvela anteriormente, está unido a FVIII por un conector escindible. Más preferentemente, el conector escindible comprende un sitio de escisión escindible por proteasas relacionadas con la coagulación de la sangre, incluso más preferentemente, el conector escindible comprende un sitio de escisión por trombina, preferentemente uno de los sitios de escisión por trombina de FVIII. Preferentemente, la secuencia conectora también comprende restos de aminoácidos adicionales, preferentemente los restos de aminoácidos adicionales se insertan entre el (los) dominio(s) del extremo C de VWF y la parte escindible del conector. Preferentemente, los restos de aminoácidos adicionales proporcionan un péptido de longitud suficiente para permitir la interacción de FVIII y VWF mediante la región a3 de FVIII y las regiones D'D3 de VWF, respectivamente. Los restos de aminoácidos adicionales pueden ser superiores a 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100 o 150 aminoácidos. Preferentemente, los restos de aminoácidos adicionales forman un péptido flexible "no estructural", y más preferentemente comprenden o incluso consisten en repeticiones de glicina-serina, repeticiones de prolina-alanina-serina, repeticiones de homocisteína, o secuencias del dominio B de FVIII.

En otra realización, el FVIII está fusionado en el extremo N con uno o más de los dominios del extremo C de VWF. Tales dominios del extremo C pueden derivar del dominio de nudo de cistina (CK) del extremo C de VWF y adicionalmente pueden comprender uno o más dominios adicionales de VWF. Más preferentemente, el FVIII comprende, preferentemente en su extremo N, los restos 2724-2813, 2722-2813, 2580-2813, 2578-2813, 2429-2813, 2400-2813, 2255-2813, 1873-2813, 1683-2813, 1277-2813, 1264-2813 o 764-2813 de SEQ ID NO: 2 o variantes de la misma, a condición de que se preserve el resto de cisteína 2773 (o equivalente del mismo). Para estas realizaciones, el producto de expresión comprendería, de extremo N a C, un péptido señal, el dominio CK de VWF, opcionalmente con dominios adicionales de VWF, preferentemente un conector escindible (opcionalmente flexible) y FVIII.

Otra realización de la invención es un complejo covalente que comprende VWF y FVIII, en el que el VWF es una forma de semivida prolongada de VWF, y en el que FVIII se modifica para comprender la región D'D3 de VWF. Preferentemente, el FVIII se modifica de tal forma que su dominio B parcial o completo esté sustituido por la región D'D3 de VWF o fragmentos de la misma (véase la Figura 5). Más preferentemente, el FVIII comprende, preferentemente en lugar de su (o parte de su) dominio B, los restos 764 a 1241 de SEQ ID NO: 2, o una variante o un fragmento de la misma.

En una realización preferida, el dominio D'D3 de VWF está unido a FVIII de forma que se genere una molécula bicatenaria tras la secreción de la molécula en el medio de cultivo celular y que el dominio D'D3 se localice en el extremo N de la cadena ligera de FVIII. Esto puede lograrse introduciendo un conector escindible que comprende, por ejemplo, un sitio de escisión para PACE/furina entre el dominio a2 de FVIII o los restos del dominio B y el dominio D'D3 de VWF (Figura 5d y e). Preferentemente, el conector comprende restos adicionales entre el dominio D'D3 de VWF y el dominio a3 de FVIII, comprendiendo los restos adicionales un péptido de longitud suficiente para permitir la interacción intramolecular de FVIII y VWF mediante las regiones a3 y D'D3, respectivamente (Figura 5e). Preferentemente, los restos adicionales comprenden menos de 200 aminoácidos, más preferentemente menos de 100 aminoácidos, incluso más preferentemente menos de 50 aminoácidos, menos de 40 aminoácidos, menos de 30 aminoácidos, menos de 20 aminoácidos, lo más preferentemente menos de 10 aminoácidos. Preferentemente, los restos adicionales comprenden un péptido flexible "no estructural", más preferentemente comprenden o incluso consisten en repeticiones de glicina-serina, repeticiones de prolina-alanina-serina o repeticiones de homocisteína. La proteína que va a expresarse para obtener la forma madura como se describe puede construirse para incluir secuencias adicionales, por ejemplo una secuencia señal en el extremo N.

Alternativamente, el extremo N de FVIII está conectado al extremo C de los dominios D'D3 de VWF o fragmentos de los mismos, que se prologa preferentemente en el extremo N por dominios adicionales de VWF (por ejemplo, los dominios D1 y D2); esto ayudará en la expresión y formación intracelular de enlaces covalentes con VWF de semivida prolongada. Más preferentemente, el FVIII comprende los restos del extremo N 1 a 1241 o los restos 764 a 1241 (después de la escisión del pro-péptido) de SEQ ID NO: 2, o una variante o un fragmento de la misma.

Preferentemente, los dominios D'D3 o D1 D2D'D3 de VWF, respectivamente, están unidos al extremo N de FVIII por un conector escindible. Más preferentemente, el conector escindible comprende un sitio de escisión escindible por una proteasa relacionada con la coagulación de la sangre, incluso más preferentemente, el conector escindible comprende un sitio de escisión por trombina, preferentemente uno de los sitios de escisión por trombina de FVIII. Preferentemente, el conector comprende restos adicionales entre los dominios D'D3 o D1 D2D'D3 de VWF y la molécula de FVIII, comprendiendo los restos adicionales un péptido de longitud suficiente para permitir la interacción de FVIII y VWF mediante las regiones a3 y D'D3, respectivamente (Figura 5e). Preferentemente, se añaden más de 20, 30, 50, 100 o 150 aminoácidos adicionales. Preferentemente, los aminoácidos adicionales comprenden un péptido flexible no estructural, más preferentemente comprenden o incluso consisten en repeticiones de glicina-

serina, repeticiones de prolina-alanina-serina, repeticiones de homo-aminoácidos, o secuencias del dominio B de FVIII.

Además, los dominios D'D3 o D1D2D'D3 de VWF fusionados con el extremo N de FVIII mediante un conector como se ha descrito anteriormente pueden ser prolongados entre D3 y el conector descrito mediante dominios de VWF adicionales derivados de VWF en caso de que funcionalidades relacionadas con VWF se incorporen en la construcción.

Un segundo aspecto de la invención es un método de producción del complejo covalente de FVIII y VWF descrito anteriormente, que comprende co-expresar las moléculas de FVIII y VWF en una línea celular eucariota. Preferentemente, la línea celular eucariota se modifica para expresar PACE/furina para garantizar el eficiente procesamiento. Alternativamente, las proteínas (FVIII y VWF) pueden producirse por separado y luego combinarse *in vitro*, por ejemplo en un entorno moderadamente oxidante para permitir la formación de puentes disulfuro, pero dejando intactas las funcionalidades de FVIII y VWF.

En otra realización de este aspecto de la invención, FVIII (modificado) y VWF (modificado) se conectan covalentemente por reticulación química (véase la Figura 7). Un tercer aspecto de la invención es un complejo covalente como se ha descrito anteriormente para su uso en medicina, preferentemente para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un trastorno de hemorragia. Preferentemente, el trastorno de hemorragia es hemofilia A o VWD.

Un cuarto aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el complejo covalente descrito anteriormente.

Un aspecto adicional es un método de tratamiento o prevención de un trastorno de hemorragia administrando una cantidad eficaz de un complejo descrito anteriormente a un sujeto en necesidad del mismo.

La invención se define en las reivindicaciones.

Descripción detallada

Como se ha mencionado anteriormente, sería altamente beneficioso tener un FVIII con una larga semivida para el tratamiento crónico de pacientes con hemofilia, en particular con hemofilia A. Los inventores han encontrado ahora sorprendentemente que puede producirse un complejo covalente de factor de von Willebrand (VWF) y FVIII, que proporciona una semivida más larga para FVIII. En particular, cuando el complejo se modifica para prolongar su semivida *in vivo*, por ejemplo cuando se usa una forma de semivida prolongada de VWF o de FVIII, se potencia significativamente la semivida de FVIII, haciendo que esto sea un enfoque atractivo para una profilaxis mejorada y el tratamiento de pacientes con trastornos de hemorragia tales como hemofilia A. Preferentemente, también puede aumentarse la recuperación *in vivo* por este enfoque.

Por tanto, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un complejo covalente que comprende factor de von Willebrand (VWF) y factor VIII (FVIII), en el que el complejo se modifica de forma que tenga una semivida *in vivo* prolongada. Por ejemplo, el VWF puede ser una forma de semivida prolongada de VWF; alternativamente, FVIII puede ser una forma de semivida prolongada de FVIII, o un resto que prolonga la semivida puede unirse a un conector. Preferentemente, el VWF en el complejo comprende un resto que prolonga la semivida.

El término "factor de von Willebrand" o "VWF", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier polipéptido que tiene la actividad biológica de VWF no mutado, que incluye variantes tales como VWF con una o más sustituciones, inserciones, deleciones de aminoácidos, o proteínas de fusión del mismo con otro péptido o resto de proteína, por ejemplo un polipéptido que aumenta la semivida, en tanto que se retenga al menos la actividad parcial de VWF. La actividad de VWF puede ser actividad de unión a colágeno, y/o actividad de unión a plaquetas, y/o actividad de unión a FVIII. Ensayos para medir la actividad de VWF están bien establecidos, por ejemplo, ensayos de unión a colágeno, ensayos de actividad del cofactor ristocetina, o ensayos de unión a FVIII. El gen que codifica VWF no mutado se transcribe en un ARNm de 9 kb que se traduce en un pre-propolipéptido de 2813 aminoácidos con un peso molecular estimado de 310.000 Da. El pre-propolipéptido contiene un péptido señal de 22 aminoácidos de longitud, un pro-polipéptido de 741 aminoácidos y la subunidad madura. La escisión del propolipéptido de 741 aminoácidos de longitud del extremo N produce VWF maduro que consiste en 2050 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos del pre-propolipéptido de VWF se muestra en SEQ ID NO: 2, y se han publicado varias variantes, por ejemplo la secuencia de referencia de NCBI NP_000543.2. A menos que se indique lo contrario, la numeración de aminoácidos de restos de VWF en la presente solicitud se refiere a SEQ ID NO: 2, aún cuando la molécula de VWF no necesite comprender todos los restos de SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos de VWF no mutado maduro se corresponde con los restos 764 a 2813 de SEQ ID NO: 2. El término "VWF", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier forma de VWF o variante del mismo que muestra al menos una actividad de VWF parcial.

El propolipéptido de VWF no mutado comprende múltiples dominios que están dispuestos en el siguiente orden (estructura de dominio de dominios D1 a D4 de pro-VWF según Schneppenheim y Budde (2011) J Thrombosis

Haemostasis 9 (Supl. 1) 209-215, estructura de dominio y nomenclatura de dominios C según Zhou et al (2012) Blood 120, 449-458):

D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK

5 El dominio D1 y D2 representan el pro-péptido que se escinde para dar el VWF maduro. El dominio D' engloba los aminoácidos 764 a 865 de SEQ ID NO: 2; el dominio D'D3 engloba los aminoácidos 764 a 1270 de SEQ ID NO: 2. Los 90 restos del extremo carboxi comprenden el dominio "CK" que es homólogo a la superfamilia del "nudo de cistina" de proteínas. Estos miembros de familia tienen una tendencia a dimerizar mediante enlaces disulfuro. Los dominios C1 a C6 de extremo C como se define por Zhou et al. se corresponden con los restos 2255 a 2333 (C1), 2334 a aproximadamente 2402 (C2), 2429 a 2496 (C3), 2497 a 2577 (C4), 2578 a 2646 (C5) y 2647 a 2722 (C6) en SEQ ID NO: 2.

10 El VWF no mutado comprende la secuencia de aminoácidos de VWF maduro como se muestra en SEQ ID NO: 2, restos 764 a 2813. También están englobadas adiciones, inserciones, deleciones del extremo N, extremo C o internas de VWF, en tanto que se retenga la actividad biológica de VWF. La actividad biológica se retiene en el sentido de la invención si el VWF con deleciones y/u otras modificaciones retiene al menos el 10 %, preferentemente el 15 %, 20 %, 25 %, o 30 %, más preferentemente al menos el 40 % o 50 %, incluso más preferentemente al menos el 60 %, 70 % o 75 % de la actividad medida para VWF no mutado. La actividad biológica de VWF no mutado puede determinarse por el experto, por ejemplo, usando métodos para medir la actividad del cofactor ristocetina (Federici AB et al. 2004. Haematologica 89:77-85), unión de VWF a GP Iba del complejo de glucoproteína de plaqueta Ib-V-IX (Sucker et al. 2006. Clin Appl Thromb Hemost. 12:305-310), o un ensayo de unión a colágeno (Kallas & Talpsep. 2001. Annals of Hematology 80:466-471), o midiendo la unión de colágeno, por ejemplo por resonancia de plasmones superficiales. Otros métodos de determinación de la actividad biológica de VWF que pueden usarse comprenden la determinación de la capacidad de unión de FVIII (Veyradier et al., Haemophilia 2011).

15 Los términos "factor de coagulación de la sangre VIII", "factor VIII" y "FVIII" se usan indistintamente en el presente documento. El "factor de coagulación de la sangre VIII" incluye FVIII de coagulación de la sangre no mutado, además de derivados o variantes de FVIII de coagulación de la sangre no mutado, donde la actividad procoagulante de FVIII de coagulación de la sangre no mutado se retiene al menos parcialmente. Los derivados pueden tener deleciones, inserciones y/o adiciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de FVIII no mutado. El término FVIII incluye la forma proteolíticamente procesada de FVIII, por ejemplo la forma bicatenaria antes de la activación, que comprende cadena pesada y cadena ligera, además de FVIII de cadena única sin escindir.

20 El término "FVIII" incluye cualquier variante de FVIII o mutantes que retienen al menos el 10 %, preferentemente al menos el 15 %, 20 % o 25 %, más preferentemente al menos el 30 %, 40 % o 50 %, lo más preferentemente al menos el 60 %, 70 % o incluso el 75 % de la actividad biológica de FVIII no mutado.

25 Se sintetiza FVIII como una cadena de polipéptidos sencilla con un peso molecular de aproximadamente 280 kDa. Se elimina el péptido señal del extremo amino tras la translocación de FVIII en el retículo endoplásmico, y la molécula de FVIII nativa madura (es decir, después de la escisión del péptido señal) es entonces proteolíticamente escindida en el transcurso de su secreción entre el dominio B y a3 o dentro del dominio B. Esto produce la liberación de un heterodímero que consiste en una cadena ligera de extremo C de aproximadamente 80 kDa en una asociación dependiente de ión metálico con un fragmento de cadena pesada del extremo N de aproximadamente 90-200 kDa (véase también la revisión por Kaufman, Transfusion Med. Revs. 6:235 (1992)).

30 La activación fisiológica del heterodímero se produce mediante escisión proteolítica de las cadenas de proteína por trombina. La trombina escinde la cadena pesada a una proteína de 90 kDa, y entonces a fragmentos de 54 kDa y 44 kDa. La trombina también escinde la cadena ligera de 80 kDa a una proteína de 72 kDa. Es la última proteína, y los dos fragmentos de cadena pesada (54 kDa y 44 kDa, anteriormente), mantenidos juntos por iones calcio, los que constituyen FVIII activo. La inactivación se produce cuando el fragmento de la cadena pesada A2 de 44 kDa se disocia de la molécula o cuando las proteínas de 72 kDa y 54 kDa son además escindidas por trombina, proteína C activada o FXa. En plasma, FVIII se estabiliza por asociación con un exceso molar de aproximadamente 50 veces de proteína VWF ("VWF"), que parece inhibir la degradación proteolítica de FVIII como se ha descrito anteriormente.

35 La secuencia de aminoácidos de FVIII está organizada en tres dominios estructurales: un dominio A triplicado de 330 aminoácidos cada uno, un único dominio B de 980 aminoácidos y un dominio C duplicado de 150 aminoácidos cada uno. El dominio B no tiene homología con otras proteínas y proporciona 18 de los 25 posibles sitios de glucosilación unidos a asparagina (N) de esta proteína. El dominio B no tiene aparentemente función en la coagulación y puede ser delecionado, teniendo todavía la molécula de FVIII delecionada en el dominio B actividad procoaguladora.

40 Como ejemplos no limitantes, FVIII como se usa en el presente documento incluye mutantes de FVIII que proporcionan escisión de APC reducida o prevenida (Amano 1998. Thromb. Haemost. 79:557-563), mutantes de FVIII con un dominio A2 estabilizado adicional (documento WO 97/40145), mutantes de FVIII que producen expresión elevada (Swaroop et al. 1997. JBC 272:24121-24124), mutantes de FVIII con inmunogenicidad reducida (Lollar 1999. Thromb. Haemost. 82:505-508), FVIII reconstituidos de cadenas pesadas y ligeras independientemente expresadas (Oh et al. 1999. Exp. Mol. Med. 31:95-100), mutantes de FVIII con unión reducida a receptores que

conducen al catabolismo de FVIII como HSPG (proteoglicanos de sulfato de heparán) y/o LRP (proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad) (Ananyeva et al. 2001. TCM, 11:251-257), variantes de FVIII estabilizadas en el enlace 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 actividad específica de cofactor elevada (Wakabayashi et al., 2005. Biochemistry 44:10298-304), mutantes de FVIII con biosíntesis y secreción mejoradas, interacción de chaperonas de ER reducida, transporte ER-Golgi mejorado, elevada activación o resistencia a la inactivación y semivida mejorada (resumido por Pipe 2004. Sem. Thromb. Hemost. 30:227-237), y mutantes de FVIII de una sola cadena no escindibles por furina.

Preferentemente, FVIII comprende la secuencia de longitud completa de FVIII como se muestra en SEQ ID NO: 6, más preferentemente, el FVIII es una variante de FVIII con una delección parcial o completa del dominio B. También están englobadas adiciones, inserciones, sustituciones, delecciones del extremo N, extremo C o internas de FVIII en tanto que la actividad biológica de FVIII sea al menos parcialmente retenida. La actividad biológica es retenida en el sentido de la invención si el FVIII con modificaciones retiene al menos el 10 %, preferentemente al menos el 15 %, 20 % o 25 %, más preferentemente al menos el 30 %, 40 % o 50 %, lo más preferentemente al menos el 60 %, 70 % o incluso el 75 % de la actividad biológica de FVIII no mutado. La actividad biológica de FVIII puede determinarse por el experto como se describe a continuación.

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

La secuencia de aminoácidos de la forma no mutada madura de FVIII de la coagulación de la sangre humana se muestra en SEQ ID NO: 6. Referencia a una posición de aminoácido de una secuencia específica significa la posición de dicho aminoácido en la proteína natural FVIII y no excluye la presencia de mutaciones, por ejemplo delecciones, inserciones y/o sustituciones en otras posiciones en la secuencia a la que se refiere. Por ejemplo, una mutación del resto 2004 con referencia a SEQ ID NO: 6 no excluye que en el homólogo modificado estén ausentes uno o más aminoácidos en las posiciones 1 a 2332 de SEQ ID NO: 6.

"FVIII" y/o "VWF", dentro de la definición anterior, también incluyen variaciones alélicas naturales que puede existir y se producen de un individuo a otro y FVIII de otras especies de mamífero, por ejemplo FVIII porcino. "FVIII" y/o "VWF" dentro de la definición anterior incluyen además variantes de FVIII y o VWF. Tales variantes se diferencian en uno o más restos de aminoácidos de la secuencia no mutada. Ejemplos de tales diferencias pueden incluir sustituciones de aminoácidos conservativas, es decir, sustituciones dentro de grupos de aminoácidos con características similares, por ejemplo (1) aminoácidos pequeños, (2) aminoácidos ácidos, (3) aminoácidos polares, (4) aminoácidos básicos, (5) aminoácidos hidrófobos y (6) aminoácidos aromáticos. Ejemplos de tales sustituciones conservativas se muestran en la siguiente Tabla 1.

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 | |

El término "resto conservado" en FVIII o VWF se refiere a un resto evolutivamente conservado, es decir, donde en la posición respectiva se encuentra un resto idéntico o sustitución conservativa en al menos dos, preferentemente al menos tres, de las secuencias de mamífero.

El término "variante" de FVIII, VWF, o dominios de los mismos, se refiere a proteínas o dominios con al menos el 50 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos el 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % o el 80 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 82 %, 84 %, 85 %, 86 % o el 88 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos el 90 %, 92 %, 94 %, 95 % de identidad de secuencia con la secuencia o parte relevante de la secuencia mostrada en SEQ ID NO 6 o 2, respectivamente, a condición de que la variante retenga al menos el 10 %, preferentemente el 15 %, 20 %, 25 % o el 30 %, más preferentemente al menos el 40 % o el 50 %, incluso más preferentemente al menos el 60 %, 70 % o el 75 % de la actividad biológica de la proteína o dominio de la misma, respectivamente. Se reconoce que ciertas posiciones pueden ser más adecuadas a la variación que otras. Por ejemplo, variantes del dominio CK de VWF necesitarán retener la cisteína en la posición

2773 (o equivalente de la misma), que parece ser esencial para la formación de dímeros. También pueden ser esenciales otros restos de cisteína en el dominio CK, y otros dominios de VWF y también de FVIII.

Para determinar el % de identidad de secuencia, las secuencias se alinean usando un programa de alineamiento de secuencias adecuado, tal como el programa GAP del paquete GCG, usando parámetros por defecto (Devereux et al. (1984) Nucl Acids Res 12, 387). Otros programas que pueden usarse para alinear secuencias incluyen FASTA (Lipman & Pearson (1985) Science 227, 1436-1441), BLAST (Altschul et al. (1990) J Mol Biol 215, 403-410) y ClustalW (Thompson et al. (1994) Nucl Acids Res 22, 4673-4680).

En una realización de la invención, el enlace covalente se logra por un puente disulfuro entre un resto de cisteína en FVIII, que se introduce en FVIII por ingeniería genética, y un resto de cisteína en VWF, que puede ser o bien una cisteína encontrada en la secuencia de VWF no mutado, o también puede introducirse en una localización apropiada en la secuencia de VWF por ingeniería genética.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a un complejo covalente que comprende VWF de semivida prolongada y FVIII, en el que FVIII se modifica por sustitución de al menos un aminoácido que existe de forma natural con un resto de cisteína o inserción de al menos un resto de cisteína en una localización apropiada en el FVIII que forma un puente disulfuro con un resto de cisteína en VWF (Figura 3).

Por tanto, según la invención, la secuencia de aminoácidos del componente de FVIII del complejo se diferencia de la de FVIII no mutado como se muestra en SEQ ID NO: 6. El FVIII modificado tiene al menos una mutación, por ejemplo una sustitución de un aminoácido que existe de forma natural con una cisteína, o una inserción de un resto de cisteína en una posición apropiada, por ejemplo en el dominio a3 o el dominio de extremo C. Así, puede haber uno o más, por ejemplo dos, tres, cuatro, cinco o más restos de cisteína adicionales en el FVIII del complejo de la invención; más preferentemente, solo se introducen uno o dos restos de cisteína adicionales, lo más preferentemente se introduce un resto de cisteína adicional.

Más preferentemente, el aminoácido que existe de forma natural que está sustituido en FVIII es un aminoácido en el dominio a3. Más preferentemente, el aminoácido que existe de forma natural en el dominio a3 es un resto ácido, preferentemente un resto ácido conservado, o un resto implicado en un fenotipo hemófilo, o un resto de Tyr que puede estar sulfatado en el dominio a3 de FVIII. Incluso más preferentemente, el aminoácido que existe de forma natural en el dominio a3 que está sustituido con cisteína está seleccionado de E1649, D1658, E1660, D1663, Y1664, D1665, D1666, E1671, E1675, D1676, D1678, I1679, Y1680, E1682, D1683, E1684 en SEQ ID NO: 6 o posición equivalente, por ejemplo en una forma genéticamente manipulada de FVIII.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el aminoácido que existe de forma natural que está sustituido con cisteína está en el dominio de extremo C de FVIII, preferentemente un aminoácido en la región de FVIII entre los aminoácidos 2051 y 2270, más preferentemente el resto está seleccionado de I2098, S2119, N2129, R2150, P2153, W2229, Q2246 en SEQ ID NO: 6 o posición equivalente, por ejemplo en una forma manipulada de FVIII.

En una realización preferida adicional del primer aspecto de la invención, VWF también se modifica por sustitución de un aminoácido que existe de forma natural con un resto de cisteína, o inserción de un resto de cisteína, que forma un puente disulfuro con un resto de cisteína introducido en FVIII. El aminoácido que existe de forma natural en VWF es un resto dentro de la región D' o D3, preferentemente un resto básico en la región D' o D3 o un resto altamente conservado en la región D' o D3 o un resto implicado en VWD de tipo N. Preferentemente, el aminoácido que existe de forma natural en VWF está seleccionado de R768, R782, R816, R820, R826, R852, R854, R906, R924, R945, R960, R976, R1035, H817, H831, H861, H874, H916, H952, H977, H1047, K773, K790, K834, K843, K855, K882, K912, K920, K922, K923, K940, K948, K968, K985, K991, K1026, K1036, K1052, K1073, G785, M800, D879, Q1053, E1078, E787, A789, T789, T791, Q793, N794, Y795, P828, F830, E835, P838, D853, W856, L884 en SEQ ID NO: 2 o posición equivalente, por ejemplo en una forma manipulada de VWF.

Más preferentemente, se introducen una o más de las siguientes combinaciones de sustituciones de restos de aminoácidos que existen de forma natural en VWF y FVIII: A/T789C:D1658C, M800C:D1658C, P828C:D1658C, F830C:D1658C, P838C:D1658C, D853C:D1658C, R924C:D1658C, E1078C:D1658C, F830C:D1663C, P838C:D1663C, D853C:D1663C, E1078C:D1663C, E1078C:Y1664C, P838C:D1665C, R816C:D1666C, F830C:D1666C, E835C:D1666C, T791C:E1671C, F830C:E1671C, E835C:E1671C, D879C:E1671C, A/T789C:E1675C, T791C:E1675C, N794C:E1675C, P828C:E1675C, F830C:E1675C, E835C:E1675C, P838C:E1675C, D879C:E1675C, R924C:E1675C, E1078C:E1675C, A/T789C:D1676C, T791C:D1676C, N794C:D1676C, F830C:D1676C, E835C:D1676C, A/T789C:D1678C, F830C:D1678C, E835C:D1678C, A/T789C:I1679C, M800C:I1679C, F830C:I1679C, E835C:I1679C, R854C:I1679C, D879C:I1679C, A/T789C:Y1680C, T791C:Y1680C, Y795C:Y1680C, M800C:Y1680C, R816C:Y1680C, F830C:Y1680C, E835C:Y1680C, R854C:Y1680C, D879C:Y1680C, A/T789C:E1682C, Y795C:E1682C, R816C:E1682C, P828C:E1682C, E835C:E1682C, P838C:E1682C, R854C:E1682C, D879C:E1682C, Q1053C:E1682C.

Preferentemente, el FVIII en el complejo de la invención es un FVIII genéticamente manipulado. El FVIII manipulado puede contener una delección del dominio B parcial o completa, puede ser un FVIII mutado que comprende una o

más sustituciones, inserciones, deleciones de aminoácidos, o combinación de los mismos, puede ser una versión de una sola cadena de FVIII, o puede ser un polipéptido de fusión con un resto que prolonga la semivida, por ejemplo una polipéptido que prolonga la semivida (HLEP). También puede ser un FVIII químicamente modificado, por ejemplo modificado por unión de un resto que prolonga la semivida tal como polietilenglicol (PEGilación), PEG glucosilado, hidroxietilalmidón (HESilación), ácidos polisialícos, polipéptido de tipo elastina, polímeros de heparosán o ácido hialurónico. También puede ser un FVIII de otras especies, por ejemplo otras especies de mamífero, por ejemplo FVIII porcino.

Preferentemente, el VWF en el complejo de la invención es una forma de semivida prolongada de VWF.

Como se usa en el presente documento, el término "semivida" indica la semivida funcional de la proteína respectiva, es decir, el tiempo para que se pierda *in vivo* la mitad de la actividad, es decir, en la sangre.

En una realización preferida, la forma de semivida prolongada de VWF en el complejo de la invención es una forma genéticamente manipulada de VWF. Más preferentemente, el VWF genéticamente manipulado es una proteína de fusión de VWF con un resto que prolonga la semivida tal como un polipéptido que prolonga la semivida (HLEP).

Un "polipéptido que potencia la semivida" o "polipéptido que prolonga la semivida" (HLEP), como se usa en el presente documento, es un resto que está fusionado con la proteína de interés, en particular con VWF, con el fin de prologar su semivida. HLEP preferidos están seleccionados del grupo que consiste en albúmina, un miembro de la familia de la albúmina, la región constante de inmunoglobulina G y fragmentos de la misma, polipéptidos o lípidos capaces de unirse en condiciones fisiológicas a la albúmina, a miembros de la familia de la albúmina, además de a porciones de una región constante de inmunoglobulina. Puede ser una proteína que potencia la semivida de longitud completa descrita en el presente documento (por ejemplo, albúmina, un miembro de la familia de la albúmina o la región constante de inmunoglobulina G) o uno o más dominios o fragmentos de los mismos que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica o la actividad biológica del factor de coagulación. Tales fragmentos pueden ser de 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, o más aminoácidos contiguos de la secuencia de HLEP o pueden incluir parte o todos los dominios específicos de HLEP respectivo, en tanto que el fragmento de HLEP proporcione una prolongación de la semivida funcional de al menos el 25 % en comparación con un VWF no mutado.

El HLEP puede ser una variante de un HLEP. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, ya sean conservativas o no conservativas, donde tales cambios permiten que las propiedades de prolongación de la semivida del HLEP sean al menos parcialmente mantenidas.

En particular, las construcciones de fusión de VWF-HLEP propuestas de la invención pueden incluir variantes polimórficas que existen de forma natural de HLEP y fragmentos de HLEP. El HLEP puede derivar de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo humano, mono, vaca, oveja o cerdo. HLEP no de mamífero incluyen, pero no se limitan a, gallina y salmón.

Preferentemente, el resto que prolonga la semivida está seleccionado de albúmina o variantes o fragmentos de la misma, región constante de inmunoglobulina o variantes y porciones de la misma, por ejemplo el fragmento Fc, cadenas al azar solvatadas con volumen hidrodinámico grande (por ejemplo XTEN, repeticiones de hom-aminoácidos (HAP) o repeticiones de prolina-alanina-serina (PAS)), afamina o variantes de la misma, alfa-fetoproteína o variantes de la misma, proteína de unión a vitamina D o variantes de la misma, transferrina o variantes de la misma, polipéptidos o lípidos capaces de unirse en condiciones fisiológicas a albúmina o regiones constantes de inmunoglobulina. Lo más preferentemente, el HLEP es albúmina de suero humana.

Los términos "albúmina de suero humana" (HSA) y "albúmina humana" (HA) se usan indistintamente en la presente solicitud. Los términos "albúmina" y "albúmina de suero" son más amplios, y engloban albúmina de suero humana (y fragmentos y variantes de la misma), además de albúmina de otras especies (y fragmentos y variantes de los mismos).

Como se usa en el presente documento, "albúmina" se refiere conjuntamente a secuencia de polipéptidos o de aminoácidos de albúmina, o un fragmento o variante de albúmina, que tiene una o más actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas) de albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a albúmina humana o fragmentos de la misma, especialmente la forma madura de albúmina humana como se muestra en SEQ ID NO: 7 en el presente documento o albúmina de otros vertebrados o fragmentos de la misma, o análogos o variantes de estas moléculas o fragmentos de las mismas.

En particular, las construcciones de fusión de VWF propuestas de la invención pueden incluir variantes polimórficas que existen de forma natural de albúmina humana y fragmentos de albúmina humana. En términos generales, un fragmento de albúmina o variante tendrá al menos 30, lo más preferentemente más de 70 aminoácidos de longitud. La variante de albúmina puede consistir preferencialmente en o comprender alternativamente al menos un dominio de albúmina completo o fragmentos de dichos dominios, por ejemplo los dominios 1 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 7), 2 (aminoácidos 195-387 de SEQ ID NO: 7), 3 (aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 7), 1 + 2 (1-387 de SEQ ID NO: 7), 2 + 3 (195-585 de SEQ ID NO: 7) o 1 + 3 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 3 + aminoácidos

388-585 de SEQ ID NO: 7). Cada dominio está él mismo constituido de dos subdominios homólogos, concretamente 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, con regiones de conector inter-subdominio flexibles que comprenden los restos Lys106 a Glu119, Glu292 a Val315 y Glu492 a Ala511.

5 La porción de albúmina de las construcciones de fusión de VWF dentro del complejo de la invención puede comprender al menos un subdominio o dominio de HA o modificaciones conservativas del mismo.

En una realización preferida, el extremo N de albúmina está fusionado con el extremo C de la secuencia de aminoácidos de VWF modificado. Es decir, el complejo de la presente invención puede comprender la estructura:

mVWF-A,

10 en la que mVWF es el VWF modificado como se ha descrito anteriormente en este documento, y A es albúmina como se ha definido anteriormente en este documento.

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

15 HLEP también puede acoplarse a VWF por un conector peptídico. El conector debe ser no inmunogénico y puede ser un conector no escindible o escindible. Conectores no escindibles pueden estar comprendidos, por ejemplo, de restos alternos de glicina y serina como se ejemplifica en el documento WO2007/090584.

20 Un posible conector peptídico entre el resto de VWF y el resto de HLEP puede también consistir en secuencias de péptidos, que sirven de conectores inter-dominio naturales en proteínas humanas. Preferentemente, tales secuencias de péptidos en su entorno natural se localizan próximas a la superficie de proteína y son accesibles al sistema inmunitario de manera que pueda asumirse una tolerancia natural contra esta secuencia. Ejemplos se dan en el documento WO2007/090584. Preferentemente, la región de conector comprende una secuencia de VWF, que debe producir un riesgo reducido de propiedades neoantigénicas de la proteína de fusión expresada.

25 Los conectores escindibles deben ser lo suficientemente flexibles para permitir la escisión por proteasas. Los péptidos de conector son preferentemente escindibles por las proteasas del sistema de coagulación, por ejemplo FIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa y FVIIa.

El HLEP también puede ser un péptido que puede unirse no covalentemente al resto que prolonga la semivida tal como una proteína que existe de forma natural en plasma humano (por ejemplo, albúmina, fragmentos de inmunoglobulina). En este caso, VWF se modificaría de tal forma que poseyera, preferentemente en el extremo C o extremo N al dominio D'D3, un resto de unión a péptido que prolonga la semivida.

30 En otra realización de la invención, la semivida de VWF se prolonga por modificación química, por ejemplo unión de un resto que prolonga la semivida tal como polietilenglicol (PEGilación), PEG glucosilado, hidroxietilalmidón (HESilación), ácidos polisilícicos, polipéptido de tipo elastina, polímeros de heparosán o ácido hialurónico.

35 Otra realización de la invención es un complejo covalente de FVIII y VWF de semivida prolongada, donde FVIII está conectado a VWF mediante un péptido adicional o secuencia de polipéptidos añadida a FVIII. Preferentemente, la secuencia añadida comprende uno o más dominios de VWF.

40 Como se ha mencionado anteriormente, durante la biosíntesis en el retículo endoplásmico, los monómeros de pro-péptido de VWF se ensamblan en dímeros mediante un puente disulfuro de extremo C formado entre los dominios de nudo de cistina (CK) del extremo C. Los inventores han encontrado ahora sorprendentemente que este dominio CK, cuando se fusiona con FVIII, conduce a un enlace disulfuro covalente entre los dominios CK introducidos en FVIII, y que están naturalmente presentes en VWF. Así, está presente otra forma novedosa de lograr el complejo covalente entre FVIII y VWF de la presente invención. La eficiencia con la que el enlace covalente se forma puede potenciarse si dominios C adicionales están incluidos en la porción del VWF que está fusionada con FVIII. Esto puede ser, por ejemplo, los dominios C5 a C6, los dominios C3 a C6 o los dominios C1 a C6 como se define por Zhou et al (2012, Blood 120, 449-458), opcionalmente prolongados mediante dominios de VWF adicionales.

45 Por tanto, otra realización de la invención es un complejo covalente que comprende VWF y FVIII, en el que el VWF es una forma de semivida prolongada de VWF, en el que el FVIII se modifica para comprender el dominio CK de VWF del extremo C, opcionalmente que contiene dominios de VWF adicionales. Preferentemente, el FVIII se modifica de tal forma en su extremo C. Más preferentemente, el FVIII comprende, preferentemente en su extremo C, los restos 2724 a 2813, 2722-2813, 2580-2813, 2578-2813, 2497-2813, 2429-2813, 2400-2813, 2334-2813, 2255-
50 2813, 1873-2813, 1683-2813, 1277-2813 o 764-2813 de SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma, a condición de que se preserve el resto de cisteína 2773 (o equivalente del mismo). Preferentemente, el FVIII modificado, además del dominio CK, comprende los dominios C6, C5 a C6, C4 a C6, C3 a C6, C2 a C6, o C1 a C6 de VWF, como se define por Zhou et al (2012, Blood 120, 449-458) o variantes de los mismos. Opcionalmente, los dominios CK y C pueden extenderse mediante dominios de VWF adicionales.

En otra realización de la invención, el FVIII está fusionado en el extremo N con uno o más de los dominios del extremo C de VWF (véase la Figura 6). Tales dominios del extremo C pueden derivarse del dominio de nudo de cistina (CK) del extremo C de VWF y adicionalmente pueden comprender uno o más de los dominios C, dominios D o dominios A de VWF hasta la secuencia de VWF completa (véase la Figura 2 para la estructura de VWF). Más preferentemente, el FVIII comprende, preferentemente en su extremo N, los restos 2724 a 2813, 2722-2813, 2580-2813, 2578-2813, 2429-2813, 2400-2813, 2255-2813, 1873-2813, 1683-2813, 1277-2813 o 1264-2813 o 764-2813 de SEQ ID NO: 2 o variantes de la misma, a condición de que se preserve el resto de cisteína 2773 (o equivalente del mismo). En esta realización, un péptido señal se añade al extremo N de los dominios de VWF, y los dominios de VWF se fusionan con el extremo N de FVIII maduro (sin péptido señal) ya sea directamente o mediante un conector polipeptídico.

Preferentemente, el dominio CK del extremo C, opcionalmente extendido mediante dominios adicionales, de VWF está unido a FVIII por un conector escindible. Una secuencia de conector puede consistir en uno o más aminoácidos, por ejemplo de 1 a 200, 1 a 150, 1 a 100, 1 a 50, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5 o 1 a 3 (por ejemplo 1, 2 o 3) aminoácidos y que pueden ser iguales o diferentes entre sí. Normalmente, las secuencias de conector no están presentes en la posición correspondiente en el factor de coagulación no mutado. Preferentemente, el conector es un conector escindible, es decir, comprende un sitio de escisión para una proteasa, preferentemente comprende un sitio de escisión que es escindible por una proteasa relacionada con la coagulación de la sangre, más preferentemente, el conector escindible comprende un sitio de escisión por trombina, incluso más preferentemente comprende uno de los sitios de escisión por trombina de FVIII. Ejemplos de conectores escindibles son

EDFDIYDEENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRN (aa1675-1720 of SEQ ID NO: 6 (FVIII)) o
 NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFSQNSRHRSTRQKQFNATTIPEN (aa714-764 de SEQ ID NO: 6)
 VVRFDDDNPSFSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV (aa357-399 de SEQ ID NO: 6) o
 VVRFDDDNPSFSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYA (aa357-396 de SEQ ID NO: 6) o
 VVRFDDDNPSFSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWD (aa357-394 de SEQ ID NO: 6)

que incluyen delecciones, inserciones y/o sustituciones de los mismos, dado que se retiene la capacidad de escisión.

Opcionalmente, el conector comprende restos de aminoácidos adicionales, que se introducen preferentemente entre el (los) dominio(s) derivado(s) de VWF y la parte escindible del conector. Preferentemente, restos adicionales proporcionan un péptido de longitud suficiente para permitir la interacción de FVIII y VWF, en particular mediante las regiones a3 y D'D3, respectivamente. Los restos de aminoácidos adicionales pueden ser superiores a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 o 150 aminoácidos. Preferentemente, los restos de aminoácidos adicionales forman un péptido flexible "no estructural", y más preferentemente comprenden o incluso consisten en repeticiones de glicina-serina, repeticiones de prolina-alanina-serina, repeticiones de homo-aminoácidos, o secuencias del dominio B de FVIII.

Otra realización de la invención es un complejo covalente que comprende VWF y FVIII, en el que el VWF es una forma de semivida prolongada de VWF, y en el que FVIII se modifica para comprender la región D'D3 de VWF, y opcionalmente dominios adicionales de VWF (Figura 5). Preferentemente, el FVIII se modifica de tal forma que su dominio B parcial o completo esté sustituido por la región D'D3 de VWF o fragmentos de la misma (Figura 5d y e). Más preferentemente, el FVIII comprende, preferentemente en lugar de su (o parte de su) dominio B, los restos 764 a 1241 de SEQ ID NO: 2, o una variante o un fragmento de la misma.

Preferentemente, el dominio D'D3 de VWF está unido a FVIII de forma que se genere una molécula de dos cadenas tras la secreción de la molécula en el medio de cultivo celular y que el dominio D'D3 se localice en el extremo N de la cadena ligera de FVIII. Esto puede lograrse introduciendo un conector escindible, que comprende, por ejemplo, un sitio de escisión para PACE/furina, entre el dominio a2 de FVIII y el dominio D'D3 de VWF (Figura 5d y e). Opcionalmente, el conector comprende restos adicionales entre el dominio D'D3 de VWF y el dominio a3 de FVIII (Figura 5e). Los restos adicionales comprenden un péptido de longitud suficiente para permitir la interacción intramolecular de FVIII y VWF mediante las regiones a3 y D'D3, respectivamente. Preferentemente, los restos adicionales son inferiores a 300, 250, 200, 150, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 o 10 aminoácidos. Los restos adicionales de aminoácidos pueden comprender un péptido flexible "no estructural", preferentemente comprenden o incluso consisten en repeticiones de glicina-serina, repeticiones de prolina-alanina-serina o repeticiones de homo-aminoácidos, o secuencias derivadas del dominio B de FVIII.

Las realizaciones descritas anteriormente son la forma madura; el experto será capaz de construir una proteína para ser expresada con el fin de obtener la forma madura, por ejemplo incluyendo secuencias adicionales, por ejemplo una secuencia señal en el extremo N.

Alternativamente, el extremo N de FVIII está conectado al extremo C de los dominios D'D3 de VWF o fragmentos de los mismos, que opcionalmente contienen dominios adicionales de VWF (por ejemplo, los dominios D1 y D2), que se extiende preferentemente en el extremo N por un péptido señal. Esto ayudará en la expresión y formación

intracelular de enlaces covalentes con VWF de semivida prolongada. Más preferentemente, la porción de VWF comprende los restos del extremo N 1 a 1241 o los restos 764 a 1241 (después de la escisión del pro-péptido) de SEQ ID NO: 2, o una variante o un fragmento de la misma.

- 5 Preferentemente, los dominios D'D3 o D1D2D'D3 de VWF, respectivamente, están unidos al extremo N de FVIII por un conector escindible. Más preferentemente, el conector escindible comprende un sitio de escisión de proteasa, más preferentemente un sitio de escisión para una de las proteasas del sistema de coagulación, incluso más preferentemente un sitio de escisión por trombina, preferentemente uno de los sitios de escisión por trombina de FVIII. Opcionalmente, el conector comprende restos adicionales entre los dominios D'D3 o D1D2D'D3 de VWF y la molécula de FVIII, comprendiendo los restos adicionales un péptido de longitud suficiente para permitir la interacción intramolecular de FVIII y VWF mediante las regiones a3 y D'D3, respectivamente. Preferentemente, se añaden más de 20, 30, 40, 50, 70, 100 o 150 aminoácidos adicionales. Preferentemente, los aminoácidos adicionales comprenden un péptido flexible no estructural, más preferentemente comprenden o incluso consisten en repeticiones de glicina-serina, repeticiones de prolina-alanina-serina, repeticiones de homo-aminoácidos, o secuencias del dominio B de FVIII.
- 10
- 15 Como alternativa adicional, el extremo C de FVIII está conectado al extremo N de los dominios D'D3 de VWF o fragmentos de los mismos. Esto ayudará en la expresión y formación intracelular de enlaces covalentes con VWF de semivida prolongada. Más preferentemente, el FVIII comprende 764 a 1241 de SEQ ID NO: 2, o una variante o un fragmento de la misma.

- 20 Preferentemente, los dominios D'D3 de VWF están unidos al extremo N de FVIII por un conector escindible. Más preferentemente, el conector escindible comprende un sitio de escisión por trombina, preferentemente uno de los sitios de escisión por trombina de FVIII. Opcionalmente, el conector comprende restos adicionales entre los dominios D'D3 de VWF y la molécula de FVIII, comprendiendo los restos adicionales un péptido de longitud suficiente para permitir la interacción de FVIII y VWF mediante las regiones a3 y D'D3, respectivamente. Preferentemente, se añaden más de 20, 30, 40, 50, 70, 100, 120 o 150 aminoácidos adicionales. Preferentemente, los aminoácidos adicionales comprenden un péptido flexible no estructural, más preferentemente comprenden o incluso consisten en repeticiones de glicina-serina, repeticiones de prolina-alanina-serina, repeticiones de homo-aminoácidos, o secuencias del dominio B de FVIII.
- 25

- 30 Preferentemente, la porción de VWF del complejo de la invención forma multímeros como lo hace en la naturaleza. Por razones particulares, puede ser deseable que la porción de VWF del complejo no forme más de un dímero. Esto puede lograrse delecionando la secuencia de pro-péptido de VWF y fusionando el péptido señal de VWF directamente al extremo N de D', permitiendo así la expresión de una molécula de VWF agotada en pro-péptido. Debido a la ausencia del pro-péptido, se bloqueará la multimerización mediante el dominio D'D3. Por otras razones particulares puede ser deseable que la porción de VWF del complejo no forme más de un monómero. Esto puede lograrse delecionando la secuencia de pro-péptido del VWF y fusionando el péptido señal de VWF directamente con D', permitiendo la expresión de una molécula de VWF agotada en pro-péptido y además introduciendo una mutación de Cys2773 en otro aminoácido adecuado, por ejemplo alanina.
- 35

Un segundo aspecto de la invención es un método de producción de los complejos covalentes de FVIII y VWF descritos anteriormente, que comprende co-expresar el FVIII y VWF en una línea celular eucariota. Por tanto, la invención también se refiere a polinucleótidos que codifican las proteínas que forman el complejo de la invención.

- 40 El término "polinucleótido(s)" generalmente se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. El polinucleótido puede ser ADN mono o bicatenario, ARN mono o bicatenario. Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido(s)" también incluye ADN o ARN que comprende una o más bases modificadas y/o bases poco usuales, tales como inosina. Se apreciará que puede prepararse una variedad de modificaciones al ADN y ARN que sirven para muchos fines útiles conocidos para aquellos expertos en la materia. El término "polinucleótido(s)", como se emplea en el presente documento, engloba tales formas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente modificadas de polinucleótidos, además de la forma química de ADN y ARN característica de virus y células, que incluyen, por ejemplo, células simples y complejas.
- 45

- 50 El experto entenderá que, debido a la degeneración del código genético, un polipéptido dado puede ser codificado por diferentes polinucleótidos. Estas "variantes" están englobadas por la presente invención.

- Preferentemente, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido aislado. El término polinucleótido "aislado" se refiere a un polinucleótido que está sustancialmente libre de otras secuencias de ácidos nucleicos, tales como y no limitadas a otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico. Pueden purificarse polinucleótidos aislados a partir de una célula hospedadora. Pueden usarse métodos de purificación de ácidos nucleicos convencionales conocidos para el experto para obtener polinucleótidos aislados. El término también incluye polinucleótidos recombinantes y polinucleótidos químicamente sintetizados. La invención se refiere además a un grupo de polinucleótidos que juntos codifican el VWF modificado y/o el FVIII modificado de la invención, o el polipéptido de la invención que comprende el VWF modificado y/o el FVIII modificado. Por ejemplo, un primer polinucleótido en el grupo puede codificar la
- 55

cadena pesada de un FVIII modificado, y un segundo polinucleótido puede codificar la cadena ligera de un FVIII modificado y un tercer polinucleótido puede codificar el VWF modificado.

Otro aspecto más de la invención es un plásmido o vector que comprende un polinucleótido según 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. Alternativamente, se clonan dos o más secuencias codificantes en un vector de expresión, ya sea usando secuencias de promotor separadas o un promotor y un elemento de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para dirigir la expresión de más de una proteína que es parte del complejo de la invención.

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

Las células hospedadoras pueden emplearse en un método de producción del complejo covalente de la invención. El método comprende:

(a) cultivar células hospedadoras de la invención en condiciones de forma que se exprese el complejo de proteína deseado; y

(b) opcionalmente recuperar el complejo de proteína deseado de las células hospedadoras o del medio de cultivo.

La producción de proteínas mutantes recombinantes a altos niveles en células hospedadoras adecuadas requiere el ensamblaje de los ADNc modificados anteriormente mencionados en unidades transcripcionales eficientes, junto con elementos reguladores adecuados en un vector de expresión recombinante que puede propagarse en diversos sistemas de expresión según métodos conocidos para aquellos expertos en la materia. Elementos reguladores de la transcripción eficientes podrían derivar de virus que tienen células de animal como sus hospedadores naturales o del ADN cromosómico de células de animal. Preferentemente, pueden usarse combinaciones de promotor-potenciador derivadas del virus simio 40, adenovirus, virus del poliovirus BK, citomegalovirus humano, o la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, o combinaciones de promotor-potenciador que incluyen genes fuertemente constitutivamente transcritos en células de animal como beta-actina o GRP78. Con el fin de lograr altos niveles estables de ARNm transcrito de los ADNc, la unidad transcripcional contiene en su parte próxima a 3' una región de ADN que codifica una secuencia de poliadenilación de terminación de la transcripción. Preferentemente, esta secuencia deriva de la región transcripcional temprana del virus simio 40, el gen de beta-globina de conejo, o el gen de activador de plasminógeno de tejido humano.

Los ADNc pueden entonces integrarse en el genoma de una línea de células hospedadoras adecuada para la expresión del FVIII modificado y/o proteínas VWF, que entonces se ensamblan en el complejo covalente de la invención. Alternativamente, también pueden usarse vectores episómicos estables que siguen en la célula como elementos extracromosómicos estables. Preferentemente, esta línea celular debe ser una línea de células de animal de origen de vertebrado con el fin de garantizar el correcto plegamiento, formación de enlaces disulfuro, glucosilación asociada a asparagina y otras modificaciones post-traduccionales, además de la secreción en el medio de cultivo. Ejemplos de otras modificaciones post-traduccionales son la O-sulfatación de tirosina y el procesamiento proteolítico de la cadena naciente de polipéptidos. Ejemplos de líneas celulares que pueden usarse son células COS de mono, células L de ratón, células C127 de ratón, células BHK-21 de hámster, células HEK-293 humanas y células CHO de hámster.

El vector de expresión recombinante que codifica los ADNc correspondientes puede introducirse en una línea celular de animal o humana de varias formas diferentes. Por ejemplo, pueden crearse vectores de expresión recombinantes a partir de vectores basándose en diferentes virus animales. Ejemplos de éstos son vectores basados en baculovirus, virus de la variolovacuna, adenovirus, y preferentemente virus del papiloma bovino.

Las unidades de transcripción que codifican los ADN correspondientes también pueden introducirse en células de animal junto con otro gen recombinante que puede funcionar de marcador de selección dominante en estas células con el fin de facilitar el aislamiento de clones de células específicas que han integrado el ADN recombinante en su genoma. Ejemplos de este tipo de genes marcadores de selección dominantes son la aminoglucósido fosfotransferasa Tn5, que confiere resistencia a geneticina (G418), higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a higromicina, y puromicina acetil transferasa, que confiere resistencia a puromicina. El vector de expresión recombinante que codifica un marcador de selección tal pueden residir o bien en el mismo vector que el que codifica el ADNc de la proteína deseada, o puede codificarse en un vector separado que se introduce simultáneamente y se integra en el genoma de la célula hospedadora, frecuentemente produciendo un estrecho enlace físico entre las diferentes unidades de transcripción.

Otros tipos de genes marcadores de selección que pueden usarse junto con el ADNc de las proteínas deseadas se basan en diversas unidades de transcripción que codifican dihidrofolato reductasa (dhfr). Después de la introducción de este tipo de gen en células que carecen de actividad endógena de dhfr, preferencialmente células CHO (DUKX-B11, DG-44), se permitirá que éstas crezcan en medio que carece de nucleósidos. Un ejemplo de un medio tal es Ham's F12 sin hipoxantina, timidina y glicina. Estos genes dhfr pueden introducirse junto con las unidades transcripcionales de ADNc en células CHO del tipo anterior, ya sea asociadas al mismo vector o en vectores diferentes, creando así líneas celulares dhfr-positivas que producen proteína recombinante.

Si las líneas celulares anteriores se cultivan en presencia del metotrexato inhibidor de dhfr citotóxico, emergerán nuevas líneas celulares resistentes a metotrexato. Estas líneas celulares pueden producir proteína recombinante a una tasa elevada debido al número amplificado de dhfr unido y las unidades transcripcionales de la proteína deseada. Cuando se propagan estas líneas celulares en concentraciones crecientes de metotrexato (1-10000 nM), pueden obtenerse nuevas líneas celulares que producen la proteína deseada a velocidad muy alta.

Las líneas celulares anteriores que producen la proteína deseada pueden cultivarse a gran escala, ya sea en cultivo en suspensión o en diversos soportes sólidos. Ejemplos de estos soportes son microvehículos basados en matrices de dextrano o colágeno, o soportes sólidos en forma de fibras huecas o diversos materiales cerámicos. Cuando se cultivan en cultivo en suspensión de células o en microvehículos, el cultivo de las líneas celulares anteriores puede realizarse o bien como un cultivo discontinuo o bien como un cultivo de perfusión con producción continua de medio acondicionado durante periodos prolongados de tiempo. Así, según la presente invención, las líneas celulares anteriores son muy aptas para el desarrollo de un proceso industrial para la producción de las proteínas mutantes recombinantes deseadas.

Se prefiere purificar el complejo de la invención a $\geq 80\%$ de pureza, más preferentemente $\geq 95\%$ de pureza, y particularmente se prefiere un estado farmacéuticamente puro que es superior al 99,9 % de pureza con respecto a macromoléculas contaminantes del cultivo celular, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y libre de agentes infecciosos y pirógenos. Preferentemente, un complejo covalente modificado aislado o purificado de la invención está sustancialmente libre de otros polipéptidos no relacionados.

El complejo covalente de la invención, que se acumula en el medio de secreción de células de los tipos anteriores, puede concentrarse y purificarse mediante una variedad de métodos bioquímicos y cromatográficos, que incluyen métodos que utilizan diferencias en tamaño, carga, hidrofobia, solubilidad, afinidad específica, etc., entre la proteína deseada y otras sustancias en el medio de cultivo de células.

Un ejemplo de tal purificación es la adsorción de la proteína mutante recombinante a un anticuerpo monoclonal, dirigido a, por ejemplo, un HLEP, preferentemente albúmina humana, o dirigido al factor de coagulación respectivo, que se inmoviliza sobre un soporte sólido. Después de la adsorción del complejo al soporte, lavado y desorción, la proteína puede purificarse adicionalmente mediante una variedad de técnicas cromatográficas basadas en las propiedades anteriores. El orden de las etapas de purificación se elige, por ejemplo, según la capacidad y selectividad de las etapas, estabilidad del soporte u otros aspectos. Etapas de purificación preferidas, por ejemplo, son, pero no se limitan a, etapas de cromatografía de intercambio iónico, etapas de cromatografía de inmunoafinidad, etapas de cromatografía de afinidad, etapas de cromatografía de interacción hidrófoba, etapas de cromatografía de colorante, etapas de cromatografía de hidroxipatita, etapas de cromatografía multimodal y etapas de cromatografía de exclusión por tamaño.

Con el fin de minimizar el riesgo teórico de contaminaciones por virus, pueden incluirse etapas adicionales en el proceso que permiten la eficaz inactivación o eliminación de virus. Tales etapas son, por ejemplo, tratamiento térmico en el estado líquido o sólido, tratamiento con disolventes y/o detergentes, radiación en el espectro visible o UV, irradiación gamma o nanofiltración.

Los polinucleótidos modificados (por ejemplo, ADN) de la presente invención también pueden integrarse en un vector de transferencia para su uso en la terapia génica humana.

En otro aspecto, el FVIII (modificado) y el VWF (modificado) se conectan covalentemente por reticulación química.

Los diversos productos de la invención son útiles como medicamentos. Por consiguiente, un tercer aspecto de la invención es un complejo covalente como se ha descrito anteriormente para su uso en medicina, preferentemente para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un trastorno de hemorragia. Preferentemente, el trastorno de hemorragia es hemofilia A o VWD.

Un cuarto aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el complejo covalente descrito anteriormente. El complejo covalente como se describe en la presente invención puede formularse en preparaciones farmacéuticas para uso terapéutico. La proteína purificada puede disolverse en disoluciones tampón acuosas fisiológicamente compatibles convencionales a las que pueden añadirse, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas.

Tales vehículos y excipientes farmacéuticos, además de formulaciones farmacéuticas adecuadas, son muy conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins",

- 5 Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)). Técnicas de formulación farmacéutica convencionales son muy conocidas para los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, 2005 Physicians' Desk Reference®, Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Gennaro et al., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000). En particular, la composición farmacéutica que comprende el complejo covalente de la invención puede formularse en forma líquida liofilizada o estable. La variante de polipéptido puede liofilizarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes de uso mediante la adición de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.
- 10 Las formulaciones de la composición se administran al individuo por cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar la composición por cualquier vía conveniente. Preferencialmente, las composiciones de la invención se administran por vía sistémica. Para uso sistémico, el complejo de la invención se formula para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmica) o enteral (por ejemplo, oral, vaginal o rectal) según métodos convencionales. Las vías de administración más preferenciales son administración intravenosa y subcutánea. Las formulaciones pueden administrarse continuamente por infusión o mediante inyección en bolo. Algunas formulaciones engloban sistemas de liberación lenta.
- 15 El complejo covalente de la presente invención se administra a los pacientes en una dosis terapéuticamente eficaz, que significa una dosis que es suficiente para producir los efectos deseados, previniendo o reduciendo la gravedad o diseminación de la afección o indicación que está tratándose sin alcanzar una dosis que produjera efectos secundarios adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores como, por ejemplo, la indicación, formulación, modo de administración y tiene que determinarse en ensayos preclínicos y clínicos para cada indicación respectiva.
- 20 La composición farmacéutica de la invención puede administrarse sola o conjuntamente con otros agentes terapéuticos. Estos agentes pueden incorporarse como parte de la misma preparación farmacéutica.
- 25 Un aspecto adicional es un método de tratamiento o prevención de un trastorno de hemorragia administrando una cantidad eficaz de un complejo descrito anteriormente a un sujeto en necesidad del mismo. En otra realización, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficiente de un polinucleótido de la invención o de un plásmido o vector de la invención. Alternativamente, el método puede comprender administrar al individuo una cantidad eficiente de las células hospedadoras de la invención descritas en el presente documento.
- 30 La presente invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes. Esta descripción de realizaciones específicas de la invención se hará conjuntamente con las figuras adjuntas.
- 35 **Figura 1:** Estructura del dominio de la proteína FVIII madura. La flecha muestra el sitio de escisión por PACE/furina, los triángulos los sitios de escisión por trombina.
- Figura 2:** Estructura del dominio de pro-VWF (A) y VWF maduro (B) según Schneppenheim y Budde, 2011, estructura y nomenclatura de dominios de los dominios C según Zhou et al., 2012. No se muestran la dimerización y multimerización de VWF.
- 40 **Figura 3:** Ejemplo de un complejo covalente donde FVIII y VWF están unidos mediante un puente disulfuro. Se muestran los dominios de VWF en gris, FVIII en blanco.
- Figura 4:** Ejemplos de FVIII modificado con dominios de VWF que incluyen el dominio CK de VWF. Se muestran dominios de FVIII en blanco, se muestran dominios de VWF en gris. Los triángulos en negro muestran sitios de escisión por trombina, los triángulos blancos muestran sitios de escisión por proteasa introducidos en el conector.
- 45 **Figura 5:** Ejemplos de FVIII modificado con dominios de VWF que incluyen dominios D'D3. Las flechas muestran sitios de escisión por PACE/furina, los triángulos negros muestran sitios de escisión por trombina, los triángulos blancos muestran sitios de escisión por proteasa introducidos en el conector.
- Figura 6:** FVIII modificado mediante dominios de VWF adicionales. Símbolos como se han explicado anteriormente.
- 50 **Figura 7:** Ejemplo de un complejo covalente unido por reticulación química.

Listado de secuencias:

SEQ ID NO: 1: Secuencia de ADNc de VWF humano

SEQ ID NO: 2: Secuencia de proteínas de VWF humano

SEQ ID NO: 3: Cebador de PCR VWF+

SEQ ID NO: 4: Cebador de PCR VWF-

SEQ ID NO: 5: Secuencia de ADNc de FVIII humano

SEQ ID NO: 6: Secuencia de proteínas de FVIII humano maduro

5 SEQ ID NO: 7: Secuencia de proteínas de albúmina de suero humana madura

SEQ ID NO: 8-88: Diversos cebadores y oligonucleótidos para mutagénesis como se enumeran en los ejemplos.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Generación de mutantes de VWF con restos de cisteína en la región D'D3

10 Se había generado previamente un plásmido de expresión (pIRESpuro3; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) que contenía una secuencia de ADNc de VWF de longitud completa en su sitio de clonación múltiple (pVWF-2448). La secuencia de ADNc de VWF contenida en este vector se presenta como SEQ ID NO. 1, su secuencia de proteínas correspondiente como SEQ ID No. 2.

15 Para generar tales vectores de expresión, el ADNc de VWF puede amplificarse por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el conjunto de cebadores VWF+ y VWF- (SEQ ID NO. 3 y 4) en condiciones estándar conocidas para aquellos expertos en la materia (y como se describe, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel FM et al. (eds.) John Wiley & Sons, Inc.; <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>) de un plásmido que contiene ADNc de VWF (como es obtenible comercialmente, por ejemplo pMT2-VWF de ATCC, No. 67122). El fragmento de PCR resultante puede digerirse por endonucleasa de restricción EcoRI y ligarse en el vector
20 de expresión pIRESpuro3 que había sido linealizado por EcoRI. El plásmido de expresión resultante, cribado para la correcta orientación del inserto, contendrá un ADNc de VWF no mutado en la dirección 3' del promotor del CMV adecuado para la expresión de VWF.

25 Con el fin de introducir mutaciones en la secuencia de VWF, se aplicó mutagénesis dirigida al sitio (kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange XL, Agilent Technologies, La Jolla, CA, EE.UU.) en el plásmido pVWF-2448 según el siguiente protocolo como se sugirió por el fabricante del kit. Por reacción de mutagénesis, se mezclaron 5 µl de 10x tampón de reacción, 1 µl de ADN de plásmido pVWF-2448 (50 ng), 1 µl (10 pmol/µl) de cada uno de los dos oligonucleótidos de mutagénesis respectivos como se expuso brevemente en la Tabla 2, 1 µl de mezcla de dNTP, 3 µl de disolución Quick, 1 µl de polimerasa Turbo (2,5 U/µl) y 37 µl de H₂O y se sometió a una
30 reacción en cadena de la polimerasa con una desnaturalización inicial durante 2 min a 95 °C, 18 ciclos de a) desnaturalización durante 50 s a 95 °C, b) hibridación durante 50 s a 60 °C y c) extensión durante 14 min a 68 °C, seguido de una única fase de extensión terminal de 7 min a 68 °C. Posteriormente, se añadió 1 µl de enzima DpnI del kit y la reacción se incubó durante otros 60 min a 37 °C. Después de eso se transformaron 3 µl de la reacción de mutagénesis en células competentes de *E. coli* (por ejemplo, XL10 Gold, Agilent Technologies). Los clones se
35 aislaron, se extrajo ADN de plásmido y las mutaciones en las secuencias de VWF se verificaron por secuenciación de ADN.

La siguiente tabla enumera los oligonucleótidos usados para la mutagénesis de la secuencia de ADNc de VWF y las mutaciones respectivas introducidas.

Tabla 2

| Designación | Secuencia de oligonucleótidos de mutagénesis (5'→3') | Mutación de VWF | SEQ ID NO |
|-------------|------------------------------------------------------|-----------------|-----------|
| We4218 | CCCGTGACAAACCTGTGGCTGAAGGGCTCGAGTG | R782C | 8 |
| We4219 | CACTCGAGCCCTTCAGCGCACAGGTTGTCAGCGGG | | 9 |
| We4226 | CAACCTGGGGCTGAATGCCTCGAGTGACCAAAACG | G785C | 10 |
| We4227 | CGTTTTGGTACACTCGAGGCATTCAGCCCCGAGGTTG | | 11 |
| We4236 | GGGCTGAAGGGCTCTGCTGTACCAAAAACGTGCCAG | E787C | 12 |
| We4237 | CTGGCACGTTTTGGTACAGCAGAGCCCTTCAGCCC | | 13 |
| We4238 | GGGCTCGAGTGTGCAAAAACGTGCCAGAACTATGAC | A789C | 14 |
| We4239 | GTCATAGTTCTGGCACGTTTTGCAACACTCGAGCCCC | | 15 |
| We4238 | GGGCTCGAGTGTGCAAAAACGTGCCAGAACTATGAC | T789C | 14 |
| We4239 | GTCATAGTTCTGGCACGTTTTGCAACACTCGAGCCCC | | 15 |
| We4240 | GGGCTCGAGTGTACCAAAATGCTGCCAGAACTATGACCTG | T791C | 16 |
| We4241 | CAGGTCATAGTTCTGGCACGATTTGGTACACTCGAGCCCC | | 17 |
| We4242 | GAGTGACCAAAAACGTGCTGCAACTATGACCTGGAGTGC | Q793C | 18 |
| We4243 | GCACCTCCAGGTCA TAGTTGCAGCACGTTTTGGTACACTC | | 19 |
| We4244 | GTACCAAAAACGTGCCAGTGC TATGACCTGGAGTGCATGA GC | | 20 |
| We4245 | GCTCATGCACTCCAGGTCA TAGCACTGGCACGTTTTGGT AC | N794C | 21 |
| We4246 | GTACCAAAAACGTGCCAGAACTGTGACCTGGAGTGCATGA GC | | 22 |
| We4247 | GCTCATGCACTCCAGGTCA CAGTTCTGGCACGTTTTGGT AC | Y795C | 23 |

| Designación | Secuencia de oligonucleótidos de mutagénesis (5'→3') | Mutación de VWF | SEQ ID NO |
|-------------|------------------------------------------------------|-----------------|-----------|
| We4228 | CTATGACCTGGAGTCTGCAGCATGGGCTGTGTCTC | M800C | 24 |
| We4229 | GAGACACAGCCCATGCTGCAGCACTCCAGGTCATAG | | 25 |
| We4220 | CCCCGGGCATGGTCTGCCATGAGAACAGATGTGTG | R816C | 26 |
| We4221 | CACACATCTGTTCTCATGGCAGACCATGCCCGGGG | | 27 |
| We4248 | GGGCATGGTCCGGTGTGAGAACAGATGTGTGGCC | H817C | 28 |
| We4249 | GGCCACACATCTGTTCTCACACCCGGACCATGCC | | 29 |
| We4250 | TGGCCCTGGAAGGTGTGCTGTCTTCCATCAGGGC | P828C | 30 |
| We4251 | GCCCTGATGGAAGCAGCAACACCTTCCAGGGCCA | | 31 |
| We4252 | GAAAGGTGCCCTGCTGCCATCAGGGCAAGGAG | F830C | 32 |
| We4253 | CTCCTTGCCCTGATGGCAGCAGGGACACCTTTC | | 33 |
| We4254 | CTTCCATCAGGGCAAGTGCTATGCCCCTGAGAAAC | E835C | 34 |
| We4255 | GTTTCTCCAGGGGCATAGCACTTGCCCTGATGGAAG | | 35 |
| We4256 | GGGCAAGGAGTATGCCTGTGGAGAAACAGTGAAGATT | P838C | 36 |
| We4257 | AATCTTCACTGTTCTCCACAGGCATCTCCTTGCCCC | | 37 |
| We4258 | CAC TTGTGTCTGTGGTGCCGGAAAGTGGAACTGCAC | D853C | 38 |
| We4259 | GTGCAGTTCACACTTCCGGCACCCGACAGACACAAGTG | | 39 |
| We4222 | CTTGTGTCTGTGGGACTGCAAGTGGAACTGCACAG | R854C | 40 |
| We4223 | CTGTGCAGTTCACACTTGCAGTCCCGACAGACACAAG | | 41 |
| We4260 | CTGTCCGGACCCGGTGTGGAAC TGACACAGACCATG | K855C | 42 |
| We4261 | CATGGTCTGTGCAGTTCAGCACCCGGTCCCGACAG | | 43 |
| We4262 | CTGTCCGGACCCGGAAGTGCAACTGCACAGACCATG | W856C | 44 |
| We4263 | CATGGTCTGTGCAGTTCACACTTCCGGTCCCGACAG | | 45 |
| We4230 | CCACTACCTCACCTTCTGCGGGCTCAAAATACCTGTTCC | D879C | 46 |

| Designación | Secuencia de oligonucleótidos de mutagénesis (5'→3') | Mutación de VWF | SEQ ID NO |
|-------------|------------------------------------------------------|-----------------|-----------|
| We4231 | GGAACAGGTATTTGAGCCCCGAGAAAGGTGAGGTAGTGG | | 47 |
| We4224 | CCTCAGTGAATGCAAGAAATGCGTCACCATCCTGGTGG | R924C | 48 |
| We4225 | CCACCAGGATGGTGACGCATTTCTTGCATTTCACTGAGG | | 49 |
| We4232 | CTGCCATAACAACATCATGAAGTGCACGATGGTGGATTC CTCCTG | Q1053C | 50 |
| We4233 | CAGGAGGAATCCACCATCGTGCACTTCATGATGTTGTTAT GGCAG | | 51 |
| We4234 | CAACAAGCTGGTGGACCCCTGCCCATATCTGGATGCTG C | E1078C | 52 |
| We4235 | GCAGACATCCAGATATGGGCAGGGTCCACCAGCTTGTT G | | 53 |

Usando los protocolos y plásmidos descritos anteriormente y aplicando técnicas de biología molecular conocidas para aquellos expertos en la materia (y como se describen, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, arriba), pueden ser preparadas otras construcciones por el experto para la mutación de otros restos de aminoácidos.

5 Para generar fusiones de albúmina de VWF y mutantes de VWF, se realizó inserción de secuencias de conector y de ADNc de albúmina en analogía a los ejemplos descritos en el documento WO 2009/156137.

Para la generación de un casete de expresión que contiene un mutante de VWF que no contiene la secuencia de pro-peptido se realiza una mutagénesis como se ha descrito anteriormente usando los cebadores

We4190 (SEQ ID NO: 54) GCCAGGGACCCTTTGTAGCCTATCCTGTCGGCCCC y

We4191 (SEQ ID NO: 55) GGGGCCGACAGGATAGGCTACAAAGGGTCCCTGGC.

10 Esto producirá una secuencia de VWF en la que el péptido señal (aminoácidos 1 a 22 de SEQ ID NO. 2) está fusionado directamente con la región D' (aminoácido 764 de SEQ ID NO. 2).

Ejemplo 2: Generación de mutantes de FVIII con restos de cisteína en el dominio a3

15 Puede usarse cualquier secuencia de ADNc de FVIII clonada en un plásmido de expresión para introducir mutaciones de Cys en el dominio a3. Preferentemente, se usa una construcción de FVIII de una sola cadena con agotamiento del dominio B parcial (véanse los ejemplos en el documento WO 2004/067566).

20 Para generar vectores de expresión de FVIII, puede amplificarse el ADNc de FVIII por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el conjunto de cebadores We3380 (GTGGCTAGCATGGAAATAGAGCTCTCCAC) (SEQ ID NO: 56) y We3381 (CACGCGCCGCTCAGTAGAGGTCCTGTGCC) (SEQ ID NO: 57) en condiciones estándar conocidas para aquellos expertos en la materia (y como se describen, por ejemplo, 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 contiene ADNc de FVIII. El fragmento de PCR resultante se digiere por endonucleasas de restricción NheI y NotI y se liga en el vector de expresión pIRESpuro3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) que había sido linealizado por NheI y NotI. El plásmido de expresión resultante contendrá un ADNc de FVIII en la dirección 3' del promotor del CMV y es adecuado para la expresión de FVIII en cultivo de células de animal.

25 Con el fin de introducir mutaciones en la secuencia de FVIII, se aplica mutagénesis dirigida al sitio (kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange XL, Agilent Technologies, La Jolla, CA, EE.UU.) en el plásmido de expresión de FVIII como se sugirió por el fabricante del kit.

La siguiente tabla enumera los oligonucleótidos usados para la mutagénesis de la secuencia de ADNc de FVIII y las mutaciones respectivas introducidas.

| Designación | Secuencia de oligonucleótidos de mutagénesis (5'→3') | Mutación de FVIII | SEQ ID NO |
|-------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------|-----------|
| We4207 | CATAAAATGTCAAAAATCTTCCTTCCTTCATGCAAACTGATATGGT ATCATCATAGTCA | | 69 |
| We4208 | GATGATACCATATCAGTTGAAAATGAAGAAGTCCGATTTTGAC ATTTATGATGAGG | E1675C | 70 |
| We4209 | CCTCATCATAAAATGTCAAAAATCGCACCTTCCTTCATTTCAACTGA TATGGTATCATC | | 71 |
| We4210 | GATACCAATATCAGTTGAAAATGAAGAAGGAAATGTTTGGACATT TATGATGAGGATG | D1676C | 72 |
| We4211 | CATCCTCATCATAAATGTCAAAACATTCCTTCCTTCATTTCAAC TGATATGGTATC | | 73 |
| We4212 | GAAATGAAGAAGGAAAGATTTTGGCAATTTATGATGAGGATGAA AATCAGAGCCCC | D1678C | 74 |
| We4213 | GGGCTCTGATTTTCATCCTCATCAATAAATGCAAAAAATCTTCC TTCTTTCATTTTC | | 75 |
| We4294 | GAAATGAAGAAGGAAAGATTTTGGACTGTTATGATGAGGATGAA AATCAGAGCCCC | I1679C | 76 |
| We4295 | GGGCTCTGATTTTCATCCTCATCAATAAATGCAAAAAATCTTCC TTCTTTCATTTTC | | 77 |
| We4214 | GAAGAAGGAAAGATTTTGGCAATTTGCGGATGAGGATGAAAAATCA GAGCC | Y1680C | 78 |
| We4215 | GGCTCTGATTTTTCATCCTCATCGCAAAATGTCAAAAATCTTCC TCCTTC | | 79 |
| We4216 | GGAAGATTTTGGACATTTATGATTTGCGGATGAAAAATCAGAGCCCC CCGCAG | E1682C | 80 |

| Designación | Secuencia de oligonucleótidos de mutagénesis (5'→3') | Mutación de FVIII | SEQ ID NO |
|-------------|-------------------------------------------------------|-------------------|-----------|
| We4217 | CTGCGGGGGCTCTGATTTTCATCGCAATCATAAAATGTCAAAA TCTTCC | | 81 |

Ejemplo 3: Generación de vectores de expresión para moléculas de FVIII con extensiones del extremo C derivadas de VWF

5 Se generaron moléculas de FVIII con dominios de VWF o fragmentos añadidos a su extremo carboxi por métodos de biología molecular conocidos para aquellos expertos en la materia. Éstos se usaron para cotransfectar con VWF-FP para generar heterodímeros que contenían FVIII modificado y VWF-FP que se unieron covalentemente mediante los dominios CK en el extremo C de ambas proteínas.

Para esto, se amplificó ADNc de FVIII por los cebadores

We4323 GTGGCTAGCGCATGGAAATAGAGCTCTCCAC (SEQ ID NO: 82)

We4324 CACGCGGCCGCGTTACCGGTGTAGAGGTCTGTGCCTCGC (SEQ ID NO: 83)

10 y el fragmento de PCR resultante se insertó en un vector de expresión adecuado, por ejemplo pIRESpuro3 (arriba) abierto por NheI y NotI. Mediante los sitios AgeI y NotI resultantes, se insertaron la secuencia codificante de los dominios derivados de VWF del extremo C C3-C4-C5-C6-CK (aminoácidos de VWF 2400 a 2813) o del dominio CK solo (aminoácidos de VWF 2724 a 2813) que habían sido amplificados por PCR usando los pares de cebadores

We4264 GTGACCGGTAACCTCCACAGTGAGCTGTCCC (SEQ ID NO: 84)

15 We4267 ACAGCGGCCGCTATCACTTGCTGCACTTCCTGG (SEQ ID NO: 85) y

We4266 GTGACCGGTTGCAACGACATCACTGCCAG (SEQ ID NO: 86)

We4267 ACAGCGGCCGCTATCACTTGCTGCACTTCCTGG (SEQ ID NO: 85), respectivamente. Esto produjo vectores de expresión que contenían ADNc de FVIII con extensiones del extremo C por dominios del extremo C de VWF C1-C2-CK o CK, respectivamente.

20 En el sitio de restricción AgeI, se introdujeron secuencias de conector escindible que liberarían el FVIII de VWF-FP durante la activación de FVIII. Las secuencias de conector se eligieron de secuencias que rodeaban uno de los sitios de escisión por trombina de FVIII, pero también podría usarse cualquier otro sitio de escisión por trombina (por ejemplo, como se describe en el documento WO 03/035861). Como un ejemplo, se representan los sitios de escisión por trombina 372 y 1689 por las siguientes secuencias de ADNc:

25 CS372 (SEQ ID NO: 87):

5' ACCGGTGATGACAACCTCTCCTTCTTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGAA
GCATCCTAAAACCTTGGACCGGT^{3'}

CS1689 (SEQ ID NO: 88):

5' ACCGGTGATGAGGATGAAAATCAGAGCCCCCGCAGCTTTCAAAAGAAAACAC
GAACTATTTTATTGCTGCAGTGGAGAGGCTCTGGACCGGT^{3'}

30 Estas secuencias pueden amplificarse por cebadores de PCR adecuados que contienen sitios de restricción AgeI en sus extremos. Entonces se escinden fragmentos de PCR por AgeI y se insertan en vectores de expresión abiertos por AgeI como se ha descrito anteriormente.

Pueden usarse enfoques similares por el experto para construir plásmidos de expresión que contienen moléculas de ADNc de FVIII donde su dominio B o partes se han sustituido por la región D'D3 de VWF o donde la región D'D3 de VWF está conectada directamente o mediante un conector al extremo N o extremo C de FVIII.

35 Ejemplo 4: Transfección de plásmidos y expresión transitoria de FVIII y mutantes de VWF en células HEK-293

Se cultivaron plásmidos de expresión basados en pIRESpuro3 en XL10 Gold (Agilent Technologies) y se purificaron usando protocolos convencionales (Qiagen, Hilden, Alemania). Se transfectaron 1x10⁶ células HEK-293 en 1 ml usando el reactivo Freestyle™ MAX de Invitrogen (15 µl) y 7,5 µg de cada una de las construcciones respectivas de ADN, y se cultivaron en medio sin suero (Invitrogen 293 Express, total 15 ml). Se cultivaron poblaciones de células transfectadas en CultiFlask 50 (Sartorius) de los que se recogieron sobrenadantes después de 48 horas para la cuantificación de antígeno de FVIII y de VWF por análisis de ELISA.

Ejemplo 5: Detección de mutantes de FVIII covalentemente unidos a mutantes de VWF

45 Se concentraron muestras de sobrenadante de cultivo celular (10 ml) de transfecciones transitorias 20x con Amicon Ultracell-30K (Millipore UFC903024; centrifugación a 3000 g durante 15 minutos). Se determinó FVIII

covalentemente unido a VWF-FP en sobrenadante de cultivo (concentrados) por un ELISA convencional. Brevemente, se incubaron microplacas con 100 µl por pocillo del anticuerpo de captura (IgG de conejo anti-VWF humano, Dako A0082 [Dako, Hamburgo, Alemania], se diluyeron 1:2000 en tampón A [Sigma C3041, Sigma-Aldrich, Munich, Alemania]) durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas tres veces con tampón B (Sigma T9039), cada pocillo se incubó con 200 µl de tampón C (Sigma T6789) durante 1,5 horas a temperatura ambiente (bloqueo). Después de otras tres etapas de lavado con tampón B, se incubaron diluciones sucesivas de la muestra de prueba en tampón B, además de diluciones sucesivas de una preparación de control de FVIII-VWF-FP covalentemente unida (2,0 - 0,03 U/ml en tampón B; volúmenes por pocillo: 100 µl) durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado con tampón B, se añadieron 200 µl de CaCl₂ 350 mM a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó CaCl₂ (sin lavado) y se añadieron 200 µl adicionales a cada pocillo y se incubaron adicionalmente durante 1 hora. Después de tres etapas de lavado con tampón B se añadieron 100 µl de una dilución 1:2 en tampón B del anticuerpo de detección (anticuerpo de detección para FVIII:C, peroxidasa marcada, Cedarlane CL20035K-D) a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado con tampón B, se añadieron 100 µl de disolución de sustrato (OUVF, Siemens Healthcare Diagnostics) por pocillo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µl de dilución de parada sin diluir (OSFA, Siemens Healthcare Diagnostics) preparó las muestras para la lectura en un lector de microplacas adecuado a 450 nm de longitud de onda. Entonces se calcularon concentraciones de las muestras de prueba usando la curva patrón con la preparación de control.

Ejemplo 6: Reticulación química de FVIII con VWF

Se hace reaccionar FVIII en una disolución de tampón acuosa que contiene preferentemente concentraciones de NaCl fisiológico y CaCl₂ a una temperatura constante de preferentemente entre 4 °C y 37 °C con un éster de bis-succinimida bi-específico (PEG)_n con un peso molecular de entre 500 Da y 100 kDa en una relación molar de FVIII y reticulante de 2:1 a 1:1000 (preferido aproximadamente 1:1). La concentración de FVIII es preferentemente baja para minimizar la reticulación de FVIII consigo mismo. Después de un periodo de 1 min a 60 min se añade un VWF de semivida prolongada a la disolución de FVIII en un exceso molar de 2:1 a 200:1 basándose en las unidades de formación de monómero de VWF. Después de un periodo de incubación de 1 a 300 min a la temperatura dada anteriormente, el reactivo residual se inactiva usando preferentemente un compuesto de bajo peso molecular que contiene un grupo amino primario y el complejo covalente de FVIII y VWF se purifica por métodos conocidos para el experto en el campo, eliminando FVIII sin reaccionar u oligómeros de FVIII y VWF sin reaccionar. Los tiempos de reacción y las temperaturas para las diferentes etapas de incubación se optimizan por métodos conocidos para el experto en el campo, por ejemplo usando SDS-PAGE/análisis de transferencia Western con anticuerpos anti-FVIII o anti-VWF con el objetivo de maximizar el contenido del complejo covalente deseado y minimizar el contenido de productos secundarios.

Pueden usarse diferentes reactivos para la reticulación química de FVIII modificado y moléculas de VWF. Se basan en la reticulación de diferentes grupos reactivos de FVIII y VWF:

- a) Reticulantes amina a amina (por ejemplo, bis-imidoéster (PEG)_n o éster de bis-succinimida (PEG)_n)
- b) Reticulantes carboxilo a carboxilo
- c) Reticulantes sulfhidrilo a sulfhidrilo (por ejemplo, bis-maleimida (PEG)_n)
- d) Reticulantes hidrato de carbono a hidrato de carbono
- e) Reticulantes amina a sulfhidrilo
- f) Reticulantes sulfhidrilo a hidrato de carbono
- g) Reticulantes sulfhidrilo a hidroxilo
- h) Reticulantes carboxilo a amina

Ejemplo 7: Análisis de la actividad del factor VIII y antígeno

Para la determinación de la actividad de FVIII:C *in vitro* se usan o bien un ensayo de coagulación (por ejemplo, reactivo Pathromtin SL y plasma deficiente en FVIII suministrados por Dade Behring, Alemania) o bien un ensayo cromogénico (por ejemplo, ensayo Coamatic FVIII:C suministrado por Haemochrom). Los ensayos se realizan según las instrucciones del fabricante.

Se determina el antígeno de FVIII (FVIII:Ag) por un ELISA estándar. Brevemente, se incuban microplacas con 100 µl por pocillo del anticuerpo de captura (IgG de oveja anti-FVIII humano, Cedarlane CL20035K-C, diluido 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 incuban diluciones sucesivas de la muestra de prueba en tampón diluyente de muestra (Cedarlane), además de diluciones sucesivas de una preparación de FVIII (CSL Behring; 200 - 2 mU/ml) en tampón diluyente de muestra (volúmenes por pocillo: 100 µl) durante dos horas a temperatura ambiente. Después de tres

etapas de lavado con tampón B, se añaden 100 µl de una dilución 1:2 en tampón B del anticuerpo de detección (IgG de oveja anti-FVIII humano, Cedarlane CL20035K-D, peroxidasa marcada) a cada pocillo y se incuban durante otra hora a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado con tampón B, se añaden 100 µl de disolución de sustrato (1:10 (v/v) de TMB OUVF: TMB Buffer OUVG, Dade Behring) por pocillo y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µl de disolución de parada (Dade Behring, OSFA) prepara las muestras para la lectura en un lector de microplacas adecuado a 450 nm de longitud de onda. Las concentraciones de muestras de prueba se calculan entonces usando la curva patrón con la preparación de FVIII como referencia.

Ejemplo 8: Análisis de actividad de VWF y antígeno

Se analizan muestras por determinación inmunoturbidimétrica de VWF:Ag (OPAB03, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburgo, Alemania) y para la unión a colágeno (Technozym VWF:CBA ELISA, Ref. 5450301 con conjunto de calibrador 5450310 y conjunto de control 5450312, Technoclone, Viena, Austria) como se describe por el fabricante.

La prueba de VWF:RCo se hace usando el reactivo de VWF BC de Siemens Healthcare Diagnostics, Marburgo, Alemania, según la descripción del fabricante. Se usa el patrón de concentrados internacional como preparación de patrón primaria para calibrar una preparación de patrón interna para uso cada día.

Para análisis farmacocinéticos se determina el antígeno de VWF por un ELISA convencional. Brevemente, se incuban microplacas con 100 µl por pocillo del anticuerpo de captura (IgG de conejo anti-vWF humano, Dako A0082 [Dako, Hamburgo, Alemania], diluido 1:2000 en tampón A [Sigma C3041, Sigma-Aldrich, Munich, Alemania]) durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas tres veces con tampón B (Sigma P3563), cada pocillo se incuba con 200 µl de tampón C (Sigma P3688) durante 1,5 horas a temperatura ambiente (bloqueo). Después de otras tres etapas de lavado con tampón B, se incuban diluciones sucesivas de la muestra de prueba en tampón B, además de diluciones sucesivas de plasma humano patrón (ORKL21; 20 - 0,2 mU/ml; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburgo, Alemania) en tampón B (volúmenes por pocillo: 100 µl) durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado con tampón B, se añaden 100 µl de una dilución 1:16000 en tampón B del anticuerpo de detección (IgG de conejo anti-vWF humano, Dako P0226, marcada con peroxidasa) a cada pocillo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado con tampón B, se añaden 100 µl de disolución de sustrato (OUVF, Siemens Healthcare Diagnostics) por pocillo y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µl de dilución de parada sin diluir (OSFA, Siemens Healthcare Diagnostics) prepara las muestras para la lectura en un lector de microplacas adecuado a 450 nm de longitud de onda. Entonces se calculan las concentraciones de las muestras de prueba usando la curva patrón con plasma humano estándar como referencia.

Ejemplo 9: Purificación de complejos FVIII/VWF-FP covalentemente unidos

Se esterilizan por filtración sobrenadantes de cultivo celular que contienen complejos de dímero FVIII/VWF-FP covalentemente unidos a través de un filtro de 0,2 µm y se concentran con una unidad UF de 30 kDa (Centramate™, Pall) hasta 20x. Se esterilizan por filtración sobrenadantes de cultivo celular que contienen complejos de multímero FVIII/VWF-FP covalentemente unidos a través de un filtro de 0,2 µm y se concentran con un concentrador en línea Cadence™ Single-Use (30 kDa de corte, Pall). Este material se aplica entonces a una columna Human Albumin Capture Select (BAC) equilibrada con tampón de equilibrio (EB, Tris 20 mM a pH 7,0). La columna se lava con EB y los complejos FVIII/VWF-FP se eluyen con MgCl₂ 2 M en EB. El pico de elución se reúne y se dializa contra tampón de equilibrio de la columna VIIISelect (GE Healthcare) que contenía HEPES 10 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, 0,03 % de Tween 80 a pH 7, como se describe por McCue et al., 2009; J. Chrom. A, 1216(45): 7824-30 con modificación menor). Este material se aplica entonces a una columna VIIISelect previamente equilibrada (GE Healthcare) y después de lavar con tampón de equilibrio (HEPES 10 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, 0,03 % de Tween80 a pH 7), va seguido de tampón de equilibrio con una alta concentración de sales (NaCl 1 M) y luego otra vez de tampón de equilibrio. Los complejos FVIII/VWF-FP se eluyen con L-His 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, 60 % de etilenglicol, 0,03 % de Tween 80, pH 7. Este eluato se dializa contra CaCl₂ 1,7 mM, L-His 10 mM, NaCl 308 mM, sacarosa 8,76 mM, 0,01 % de Tween 80, pH 7. Finalmente, el material se congela en alícuotas.

Ejemplo 10: Análisis farmacocinético de complejos FVIII/VWF covalentemente unidos en ratas

Los complejos FVIII/VWF se administran por vía intravenosa a ratas CD / Lewis anestesiadas (6 ratas por sustancia) con una dosis de 100 UI (VWF:Ag)/kg de peso corporal. Se extraen muestras de sangre a intervalos apropiados empezando 5 minutos después de la aplicación de las sustancias de prueba usando un esquema de muestreo alterno, produciendo muestras de 3 animales / momento de tiempo (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 diseña para minimizar los posibles efectos del muestreo de sangre sobre la concentración plasmática que va a cuantificarse. La sangre se procesa para plasma y se guarda congelada hasta el análisis. El contenido de antígeno de FVIII y VWF se cuantifica posteriormente por ensayos de ELISA específicos (véase anteriormente). Los valores medios de los grupos de tratamiento se usan para calcular la recuperación *in vivo* después de 5 min. Las semividas se calculan usando los momentos de tiempo de la fase beta de eliminación según la fórmula $t_{1/2} = \ln 2 / k$, mientras que k es la pendiente de

la línea de regresión. El antígeno se usa normalmente como una medida en estudios farmacocinéticos en animales normales con el fin de eliminar los antecedentes de la actividad de FVIII intrínseca en los animales de las mediciones. Se espera que se correlacionen el antígeno y la actividad funcional.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> CSL Behring GmbH
- <120> Complejo
- <130> A198
- 10 <160> 88
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1
- <211> 8442
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 20 <400> 1

ES 2 657 291 T3

atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt gccagggacc 60
 ctttgtgcag aaggaactcg cggcaggtca tccaogggccc gatgcagcct tttcgggaagt 120
 gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg cagttacctc 180
 ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca gaatggcaag 240
 agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttgtt tgtcaatggt 300
 accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg gctgtatcta 360
 gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt ggccaggatc 420
 gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa gacctgcggg 480
 ctgtgtggca actttaacat ctttgcctgaa gatgacttta tgaccaaga agggaccttg 540
 acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga acagtgggtg 600
 gaaogggcat ctctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat gcagaagggc 660
 ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcgggtg ttgcccgcctg ccacctctg 720
 gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg tgctgggggg 780
 ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccgga cctgtgcca ggagggaatg 840
 gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgacagcccag tgtgccctgc tggatggag 900
 tataggcagt gtgtgtccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat caatgaaatg 960
 tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgccctgagg gacagctcct ggatgaaggc 1020
 ctctcgggtg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgta ccctcccggc 1080
 acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg gatctgcagc 1140
 aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc acaggtcaat cacacttcaa gagctttgac 1200
 aacagatact tcacctcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga ttgccaggac 1260
 cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgca cgctgtgtgc 1320
 acccgtccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtgaa actgaagcat 1380
 ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac gtccagctcc ccctcctgaa aggtgacctc 1440

ES 2 657 291 T3

cgcattccagc atacagtgac ggccctccgtg cgcctcagct acggggagga cctgcagatg 1500
 gactgggatg gccgcgggag gctgctggtg aagctgtccc ccgtctatgc cgggaagacc 1560
 tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg acttccttac cccctctggg 1620
 ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg ggactgccag 1680
 gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcatgac caggttctcc 1740
 gaggaggcgt gcgcggctct gacgtccccc acattcgagg cctgccatcg tgccgtcagc 1800
 ccgctgccct acctgcgga ctgccgtac gacgtgtgct cctgctcgga cggcccgag 1860
 tgcctgtgcg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg cgtgcgcgtc 1920
 gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt gtacctgcag 1980
 tgcgggacc cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccggatga ggaatgcaat 2040
 gaggcctgcc tggagggtcg ctctgcccc ccagggtctt acatggatga gaggggggac 2100
 tgcgtgccc aggccagtg cccctgttac tatgacggtg agatctcca gccagaagac 2160
 atcttctcag accatcacac catgtgctac tgtgaggatg gcttcatgca ctgtaccatg 2220
 agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagteccct gtctcatcgc 2280
 agcaaaaagga gcctatcctg tcggccccc atggtcaagc tgggtgtgctc cgctgacaac 2340
 ctgcgggctg aagggtctga gtgtacaaa acgtgccaga actatgacct ggagtgcag 2400
 agcatgggt gtgtctctgg ctgcctctgc cccccggca tggtcggca tgagaacaga 2460
 tgtgtggccc tggaaagggt tccctgctc catcagggca aggagtatgc ccctggagaa 2520
 acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgtcgggacc ggaagtggaa ctgcacagac 2580
 catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgatc ggcatggccc actacctcac cttcgacggg 2640
 ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctg tgcaggatta ctgcggcagt 2700
 aaccctggga ccttcggat cctagtgggg aataagggat gcagccacc ctcagtgaaa 2760
 tgcaagaaac gggtcacccat cctgggtggag ggaggagaga ttgagctgtt tgacggggag 2820
 gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga gtctggccgg 2880
 tacatcattc tctgtctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca cctgagcate 2940
 tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg gaattttgat 3000
 ggcattcaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga cctgtggac 3060
 tttgggaact cctggaaagt gagctcgag tgtgctgaca ccagaaaagt gcctctggac 3120
 tcatccctg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatggtgga ttctctctgt 3180
 agaatcctta ccagtgcagt ctccaggac tgcaacaagc tgggtggacc cgagccatat 3240
 ctggatgtct gcatttacga cacctgctc tgtgagtcca ttggggactg cgcctgcttc 3300
 tgcgacacca ttgctgccta tgcccacgtg tgtgccagc atggcaaggt ggtgacctgg 3360

ES 2 657 291 T3

aggacggcca cattgtgcc ccagagctgc gaggagagga atctccggga gaacgggtat 3420
gagtgtgagt ggcgctataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg tcagcacctc 3480
gagccactgg cctgcctgtg gcagtgtgtg gagggtgtcc atgccactg ccctccaggg 3540
aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgacctg aagactgtcc agtgtgtgag 3600
gtggctggcc ggcgttttgc ctacggaaag aaagtcacct tgaatcccag tgacctgag 3660
cactgccaga tttgccactg tgatgttgc aacctcacct gtgaagcctg ccaggagccg 3720
ggaggcctgg tgggtcctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct gtatgtggag 3780
gacatctcgg aaccgccgtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgga cctggtcttc 3840
ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagtttg aagtgtgaa ggcctttgtg 3900
gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc cgtggtggag 3960
taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc gtcagagctg 4020
cggcgcattg ccagccaggt gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac cagcgaggtc 4080
ttgaaatata cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc ctcccgcac 4140
gccctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt tgtccgctac 4200
gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccg tgggcattgg gccccatgcc 4260
aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggcccctg agaacaaggc cttcgtgctg 4320
agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct ctgtgacctt 4380
gccctgaag cccctcctcc tactctgcc cccacatgg cacaagtcac tgtgggcccg 4440
gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatggttct ggatgtggcg 4500
ttcgtcctgg aaggatcggg caaaattggt gaagccgact tcaacaggag caaggagttc 4560
atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggcaggaca gcatccacgt cacggtgctg 4620
cagtactcct acatggtgac cgtggagtac ccttcagcg aggcacagtc caaaggggac 4680
atcctgcagc ggggtcggaga gatccgctac caggcggca acaggaccaa cactgggctg 4740
gccctgcggg acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg ggagcaggcg 4800
cccaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa gaggetgcct 4860
ggagacatcc aggtggtgcc cattggagtg ggcctaatag ccaacgtgca ggagctggag 4920
aggattggct ggccaatgc ccctatctc atccaggact ttgagacgct cccccgagag 4980
gctcctgacc tgggtgctga gaggtgctgc tccggagagg ggetgcagat cccacacctc 5040
tcccctgcac ctgactgcag ccagcccctg gacgtgatcc ttctcctgga tggctcctcc 5100
agtttcccag cttcttattt tgatgaaatg aagagtttcg ccaaggcttt catttcaaaa 5160
gccaatatag ggcctcgtct cactcaggtg tcagtgtgac agtatggaag catcaccacc 5220
attgacgtgc catggaacgt ggtcccggag aaagcccatt tgctgagcct tgtggacgtc 5280
atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tgggctttgc tgtgcgatac 5340

ES 2 657 291 T3

ttgacttcag aaatgcatgg ggcgcgcccg ggagcctcaa aggcggtggt catcctggtc 5400
 acggacgtct ctgtggatc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc caacagagtg 5460
 acagtgttcc ctattggaat tggagatcgc tacgatgcag cccagctaog gatcttggca 5520
 ggcccagcag gcgactccaa cgtggtgaag ctccagcga tcaagacct ccctaccatg 5580
 gtcaccttgg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctg gatttgtag gatttgcag 5640
 gatgaggatg ggaatgagaa gagggcccgg gacgtctgga ccttgccaga ccagtgccac 5700
 accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcacgggt caactgtgac 5760
 cgggggctga ggcttctgtg ccctaacagc cagtcccctg ttaaagtgga agagacctgt 5820
 ggctgcctgt ggaacctgcc ctgcgtgtgc acaggcagct ccactcggca catcgtgacc 5880
 tttgatgggc agaatttcaa gctgactggc agctgttctt atgtcctatt tcaaaacaag 5940
 gagcaggacc tggaggatg tctccataat ggtgcctgca gccctggagc aaggcagggc 6000
 tgcataaat ccatcgaggt gaagcacagt gccctctccg tcgagctgca cagtgacatg 6060
 gaggtgacgg tgaatgggag actggtctct gttccttacg tgggtgggaa catggaagtc 6120
 aacgtttatg gtgccatcat gcatgaggtc agattcaatc accttggcca catcttcaca 6180
 ttcactccac aaaacaatga gttccaactg cagctcagcc ccaagacttt tgcttcaaag 6240
 acgtatggtc tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca atgacttcat gctgagggat 6300
 ggcacagtca ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca gcggccaggg 6360
 cagacgtgcc agccatcct ggaggagcag tgtcttgtcc ccgacagctc ccactgccag 6420
 gtcctcctct taccactgtt tgctgaatgc cacaaggctc tggtccagc cacattctat 6480
 gccatctgcc agcaggacag ttgccaccag gagcaagtgt gtgaggtgat cgcctcttat 6540
 gccacctct ctgcggaccaa cggggtctgc gttgactgga ggacacctga tttctgtgct 6600
 atgtcatgcc caccatctct ggtttataac cactgtgagc atggctgtcc ccggcactgt 6660
 gatggcaacg tgagctcctg tggggaccat ccctccgaag gctgtttctg ccctccagat 6720
 aaagtcatgt tgggaaggcag ctgtgtccct gaagaggcct gcactcagtg cattggtgag 6780
 gatggagtcc agcaccagt cctggaagcc tgggtcccgg accaccagcc ctgtcagatc 6840
 tgcacatgcc tcagcggcg gaaggtcaac tgcacaacgc agccctgcc caccggccaaa 6900
 gctcccacgt gtggcctgtg tgaagtagcc cgcctccgcc agaatgcaga ccagtgtgc 6960
 cccgagtatg agtgtgtgtg tgaccagtg agctgtgacc tgccccagt gcctcactgt 7020
 gaacgtggcc tcagcccaac actgaccaac cctggcgagt gcagaccaa ctccactgc 7080
 gcctgcagga aggaggagtg caaaagagtg tccccacct cctgcccccc gcaccgtttg 7140
 cccacccttc ggaagaccca gtgtgtgat gattatgagt gtgcctgcaa ctgtgtcaac 7200
 tccacagtga gctgtcccct tgggtacttg gcctcaaccg ccaccaatga ctgtggctgt 7260

ES 2 657 291 T3

accacaacca cctgccttcc cgacaagggtg tgtgtccacc gaagcaccat ctaccctgtg 7320
ggccagttct gggaggaggg ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga ggatgccgtg 7380
atgggcctcc gcgaggccca gtgctcccag aagccctgtg aggacagctg tccgtcgggc 7440
ttcaacttacg ttctgcatga aggcgagtgc tgtggaaggt gcctgccatc tgcctgtgag 7500
gtggtgactg gctcaccgcg gggggactcc cagtcttctt ggaagagtgt cggctcccag 7560
tgggcctccc cggagaacct ctgcctcatc aatgagtgtg tccgagtga ggaggaggtc 7620
tttatacaac aaaggaacgt ctccctgccc cagctggagg tccctgtctg ccctcgggc 7680
tttcagctga gctgtaagac ctccagctgc tgcceaagct gtcgctgtga gcgcatggag 7740
gcctgcatgc tcaatggcac tgtcattggg cccgggaaga ctgtgatgat cgatgtgtgc 7800
acgacctgcc gctgcatggt gcagtgagg gtcactctctg gattcaagct ggagtgcagg 7860
aagaccacct gcaaccctg cccctgggt tacaaggaag aaaataacac aggtgaatgt 7920
tgtgggagat gtttgctac ggcttgcacc attcagctaa gaggaggaca gatcatgaca 7980
ctgaagcgtg atgagacgct ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa ggtcaatgag 8040
agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc cacccttga tgaacacaag 8100
tgtctggctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgctgtga cacatgtgag 8160
gagcctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaaggtggg aagctgtaag 8220
tctgaagtag aggtggatat ccactactgc cagggcaaat gtgccagcaa agccatgtac 8280
tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgctctctgt gctctccgac acggacggag 8340
cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtaccatga ggttctcaat 8400
gccatggagt gcaaagtctc ccccaggaag tgcagcaagt ga 8442

<210> 2

<211> 2813

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 657 291 T3

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

ES 2 657 291 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 657 291 T3

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
 595 600 605
 Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
 610 615 620
 Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
 625 630 635 640
 Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
 645 650 655
 Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
 660 665 670
 Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
 675 680 685
 Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
 690 695 700
 Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
 705 710 715 720
 Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
 725 730 735
 His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
 740 745 750
 Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
 755 760 765
 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

ES 2 657 291 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 657 291 T3

| | | | | |
|---------|---------------------|---------------------|-------------|------|
| 1100 | | 1105 | | 1110 |
| His Gly | Lys Val Val Thr Trp | Arg Thr Ala Thr Leu | Cys Pro Gln | |
| 1115 | | 1120 | 1125 | |
| Ser Cys | Glu Glu Arg Asn Leu | Arg Glu Asn Gly Tyr | Glu Cys Glu | |
| 1130 | | 1135 | 1140 | |
| Trp Arg | Tyr Asn Ser Cys Ala | Pro Ala Cys Gln Val | Thr Cys Gln | |
| 1145 | | 1150 | 1155 | |
| His Pro | Glu Pro Leu Ala Cys | Pro Val Gln Cys Val | Glu Gly Cys | |
| 1160 | | 1165 | 1170 | |
| His Ala | His Cys Pro Pro Gly | Lys Ile Leu Asp Glu | Leu Leu Gln | |
| 1175 | | 1180 | 1185 | |
| Thr Cys | Val Asp Pro Glu Asp | Cys Pro Val Cys Glu | Val Ala Gly | |
| 1190 | | 1195 | 1200 | |
| Arg Arg | Phe Ala Ser Gly Lys | Lys Val Thr Leu Asn | Pro Ser Asp | |
| 1205 | | 1210 | 1215 | |
| Pro Glu | His Cys Gln Ile Cys | His Cys Asp Val Val | Asn Leu Thr | |
| 1220 | | 1225 | 1230 | |
| Cys Glu | Ala Cys Gln Glu Pro | Gly Gly Leu Val Val | Pro Pro Thr | |
| 1235 | | 1240 | 1245 | |
| Asp Ala | Pro Val Ser Pro Thr | Thr Leu Tyr Val Glu | Asp Ile Ser | |
| 1250 | | 1255 | 1260 | |
| 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 | |

ES 2 657 291 T3

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 Ala 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 His Met
 1460 1465 1470

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

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

ES 2 657 291 T3

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

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

ES 2 657 291 T3

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

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

ES 2 657 291 T3

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

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

ES 2 657 291 T3

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

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> 3

5 <211> 30

<212> ADN

ES 2 657 291 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

5

<400> 3

ttcgaattcc cgcagccctc attgcaggg 30

<210> 4

<211> 31

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

15

<400> 4

tccgaattcc ggcagcagca ggcacccatg c 31

<210> 5

20

<211> 7056

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

25

ES 2 657 291 T3

| | |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc | 60 |
| accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc | 120 |
| ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttctc cctagagtgc caaatcttt tccattcaac | 180 |
| acctcagtcg tgtacaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc | 240 |
| gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggctcta ccatccaggc tgaggtttat | 300 |
| gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttccatc ctgtcagtct tcatgctggt | 360 |
| ggtgtatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg | 420 |
| gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg | 480 |
| aaagagaatg gtccaatggc ctctgacca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat | 540 |
| gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa | 600 |
| gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttctgta | 660 |
| ttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat | 720 |
| gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct | 780 |
| ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgtgat tggaatgggc | 840 |
| accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca ctttcttgt gaggaacct | 900 |
| cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg | 960 |

ES 2 657 291 T3

gacctggac agtttctact gttttgcat atctcttccc accaacatga tggcatggaa 1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080
gaagcggaa actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat 1140
gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgtcagttg ccaagaagca tcctaaaact 1200
tgggtacatt acattgtgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtctctgcc 1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg 1320
aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380
attcagcatg aatcaggaat ctggggacct ttactttatg ggggaagttg agacacactg 1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt gaaggtttt 1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620
actaaatcag atcctcggtg cctgaccgc tattactcta gttctgtaa tatggagaga 1680
gatctagctt caggactcat tgccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttc tcccaatcc agctggagtg 1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt 1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattetaagc 1980
attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040
atggctctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaactgt cttcatgtcg 2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160
atgaccgctt tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacaggac 2220
agttatgaag atatttcagc atacttctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc 2280
ttctcccaga attcaagaca ccctagcaact aggcaaaagc aatttaatgc caccacaatt 2340
ccagaaaatg acatagagaa gactgaccct tggtttgac acagaacacc tatgcctaaa 2400
atacaaaatg tctctctag tgatttgtg atgctcttgc gacagagtcc tactccacat 2460
gggctatcct tatctgatct ccaagaagcc aaatatgaga ctttttctga tgatccatca 2520
cctggagcaa tagacagtaa taacagcctg tetgaaatga cacacttcag gccacagctc 2580
catcacagtg gggacatggt atttaccctt gagtcaggcc tccaattaag attaaatgag 2640
aaactgggga caactgcagc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttctagtaca 2700
tcaaataatc tgatttcaac aattccatca gacaatttgg cagcaggtag tgataataca 2760
agttccttag gaccccaag tatgccagtt cattatgata gtcaattaga taccactcta 2820
tttggcaaaa agtcatctcc ccttactgag tctggtggac ctctgagctt gagtgaagaa 2880

ES 2 657 291 T3

aataatgatt caaagttggt agaatcaggt ttaatgaata gccaaagaag ttcattggga 2940
aaaaatgat cgtcaacaga gagggtagg ttatttaag ggaaaagagc tcatggacct 3000
gctttgttga ctaaagataa tgccttattc aaagttagca tctctttggt 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 aaaacatgg aatgggtcca acagaaaaaa 3300
gagggcccca ttccaccaga tgcacaaaat ccagatatgt cgttctttaa gatgctattc 3360
ttgccagaat cagcaagggt gatacaaaag 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 aaaaaatctc aggaagaaat agaaaagaag 3660
gaaacattaa tccaagagaa tgtagttttg cctcagatag atacagtgc tggcactaag 3720
aatttcatga agaacctttt cttactgagc actaggcaaa atgtagaagg ttcattatgac 3780
ggggcatatg ctccagtact tcaagatttt aggtcattaa atgattcaac aaatagaaca 3840
aagaaacaca cagctcattt ctcaaaaaa gggagggaag aaaacttggg aggcttggga 3900
aatcaaacca agcaaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatata tccctaataca 3960
agccagcaga attttgtcac gcaacgtagt aagagagctt tgaacaatt cagactccca 4020
ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acacctcaac ccagtgttcc 4080
aaaaacatga aacatttgac cccgagcacc ctcacacaga tagactaca tgagaaggag 4140
aaaggggcca ttactcagtc tcccttatca gattgcctta cgaggagtca tagcatccct 4200
caagcaaata gatctccatt acccattgca aaggtatcat catttccatc tatttagacct 4260
atatatctga ccagggtcct attccaagac aactcttctc atcttccagc agcatcttat 4320
agaaagaaag attctggggt ccaagaaagc agtcatttct tacaaggagc caaaaaaat 4380
aacctttctt tagccattct aaccttgag atgactggtg atcaaagaga ggttggctcc 4440
ctggggacaa gtgccacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctcccg 4500
aaaccagact tgcccaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaaagt tcacatttat 4560
cagaaggacc tattcctac ggaactagc aatgggtctc ctggccatct ggatctcgtg 4620
gaagggagcc ttcttcaggg aacagaggga gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct 4680
ggaaaagttc ctttctgag agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta 4740
ttggatctc ttgcttggga taaccactat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa 4800
tccaagaga agtcaccaga aaaaacagct ttaagaaaa aggataccat tttgtccctg 4860

ES 2 657 291 T3

aacgcttgtg aaagcaatca tgcaatagca gcaataaatg agggacaaaa taagcccgaa 4920
 atagaagtca cctgggcaaa gcaaggtagg actgaaaggc tgtgctctca aaaccacca 4980
 gtcttgaaac gccatcaacg ggaataaact cgtactactc ttcagtcaga tcaagaggaa 5040
 attgactatg atgataccat atcagttgaa atgaagaagg aagatthttga catttatgat 5100
 gaggatgaaa atcagagccc ccgcagcttt caaaagaaaa cacgacacta ttttattgct 5160
 gcagtggaga ggctctggga ttatgggatg agtagctccc cacatgttct aagaacaggg 5220
 gctcagagtg gcagtgtccc tcagttcaag aaagttgttt tccaggaatt tactgatggc 5280
 tcctttactc agcccttata ccgtggagaa ctaaatgaac atttgggact cctggggcca 5340
 tatataagag cagaagttga agataatata atggtaactt tcagaaatca ggcctctcgt 5400
 ccctattcct tctattctag ccttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa 5460
 cctagaaaaa actttgtcaa gcctaataaa accaaaactt acttttggaa agtgcaacat 5520
 catatggcac ccactaaaga tgagtttgac tgcaaagcct gggcttattt ctctgatgtt 5580
 gacctggaaa aagatgtgca ctcaggcctg attggacccc ttctggctctg ccacactaac 5640
 aactgaacc ctgctcatgg gagacaagtg acagtacagg aatttgctct gttttcacc 5700
 atctttgatg agacccaaaag ctggtacttc actgaaaata tggaagaaa ctgcagggct 5760
 ccctgcaata tccagatgga agatcccact ttaaaagaga attatcgctt ccatgcaatc 5820
 aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctccagatca aaggattcga 5880
 tggatctctc tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat 5940
 gtgttactct tacgaaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccaggt 6000
 gtttttgaga cagtggaaat gttaccatcc aaagctggaa tttggcgggt ggaatgcctt 6060
 attggcgagc atctacatgc tgggatgagc acactttttc tgggttacag caataagtgt 6120
 cagactcccc tgggaatggc ttctggacac attagagatt ttcagattac agcttcagga 6180
 caatatggag agtgggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc 6240
 tggagcacca aggagccctt ttcttggatc aaggtggatc tgttggcacc aatgattatt 6300
 cacggcatca agaccaggg tgcccgtcag aagttctcca gcctctacat ctctcagttt 6360
 atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt atcagggaaa ttccactgga 6420
 accttaatgg tcttctttgg caatgtggat tcatctggga taaaacacaa tatttttaac 6480
 cctccaatta ttgctcgata catccgtttg caccctaactc attatagcat tcgcagcact 6540
 cttcgcattg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaatggag 6600
 agtaaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcatcct actttaccaa tatgtttgce 6660
 acctggtctc cttcaaaaag tcgacttcac ctccaagga ggagtaatgc ctggagacct 6720
 caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtca 6780
 ggagtaacta ctcagggagt aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttcctc 6840
 atctccagca gtcaagatgg ccatcagtggt actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag 6900
 gtttttcagg gaaatcaaga ctccctcaca cctgtggatg actctctaga cccaccgtta 6960
 ctgactcgct accttcgaat tcacccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg 7020
 gagttctgg gctgcgaggc acaggacctc tactga 7056

ES 2 657 291 T3

<210> 6

<211> 2332

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 6

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

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

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

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

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

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
 85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
 100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
 115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
 130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
 145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
 165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
 180 185 190

ES 2 657 291 T3

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
 195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
 210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
 225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 657 291 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu

ES 2 657 291 T3

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

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

Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
 1010 1015 1020

Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
 1025 1030 1035

Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
 1040 1045 1050

Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
 1055 1060 1065

Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
 1070 1075 1080

Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
 1085 1090 1095

Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His
 1100 1105 1110

Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
 1115 1120 1125

Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe
 1130 1135 1140

Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr
 1145 1150 1155

Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn
 1160 1165 1170

Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His
 1175 1180 1185

Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr
 1190 1195 1200

Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr
 1205 1210 1215

ES 2 657 291 T3

Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg
 1220 1225 1230

Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu
 1235 1240 1245

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 657 291 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 657 291 T3

| | | | | |
|-------------------------------------------------------------|--|------|--|------|
| 1700 | | 1705 | | 1710 |
| Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro | | | | |
| 1715 | | 1720 | | 1725 |
| Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe | | | | |
| 1730 | | 1735 | | 1740 |
| Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu | | | | |
| 1745 | | 1750 | | 1755 |
| Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val | | | | |
| 1760 | | 1765 | | 1770 |
| Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser | | | | |
| 1775 | | 1780 | | 1785 |
| Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg | | | | |
| 1790 | | 1795 | | 1800 |
| Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys | | | | |
| 1805 | | 1810 | | 1815 |
| Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys | | | | |
| 1820 | | 1825 | | 1830 |
| Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His | | | | |
| 1835 | | 1840 | | 1845 |
| Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu | | | | |
| 1850 | | 1855 | | 1860 |
| Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu | | | | |
| 1865 | | 1870 | | 1875 |
| Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu | | | | |
| 1880 | | 1885 | | 1890 |
| Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu | | | | |
| 1895 | | 1900 | | 1905 |
| Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly | | | | |
| 1910 | | 1915 | | 1920 |
| Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln | | | | |
| 1925 | | 1930 | | 1935 |
| Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile | | | | |
| 1940 | | 1945 | | 1950 |

ES 2 657 291 T3

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

ES 2 657 291 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Asp Leu Tyr
 2330

<210> 7

<211> 585

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

10

ES 2 657 291 T3

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> 8

<211> 35

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 8
 5 cccgctgaca acctgtgcbc tgaaggctc gagtg 35

<210> 9
 <211> 35
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 9
 15 cactcgagcc cttcagcgc caggtgtca gcggg 35

<210> 10
 <211> 37
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 10
 25 caacctgcbg gctgaatgcc tcgagtgac caaaacg 37

<210> 11
 <211> 37
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 11

cgtttgta cactcgaggc attcagcccg cagggtg 37

<210> 12
 <211> 35
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido para mutagénesis
 10

<400> 12
 gggctgaagg gctctgctgt accaaaacgt gccag 35

<210> 13
 15 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 13
 ctggcacgtt ttgtacagc agagccctc agccc 35

<210> 14
 25 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 14
 gggctcgagt gttgcaaac gtgccagaac tatgac 36
 35

<210> 15
 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 15

gtcatagttc tggcagttt tgcaacactc gagccc 36

10 <210> 16

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 16

gggctcagat gtaccaaatg ctgccagaac tatgacctg 39

20

<210> 17

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 17

30 caggatcatag ttctggcagc atttggtaca ctgagccc 39

<210> 18

<211> 39

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 657 291 T3

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 18

gagtgtagca aaacgtgctg caactatgac ctggagtgc 39

5

<210> 19

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 19

gcaactcagg tcatagttgc agcacgtttt ggtacactc 39

15

<210> 20

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 20

gtaccaaacc gtagcagtc tatgacctgg agtgcattg c 41

25

<210> 21

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

35

<400> 21

gctcattgac tccaggtcat agcactggca cgttttgga c 41
66

<210> 22

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 22

10 gtaccaaac gtgccagaac tgtgacctgg agtgcattgag c 41

<210> 23

<211> 41

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

20 <400> 23

gctcattgac tccaggtcac agttctggca cgttttgga c 41

<210> 24

<211> 36

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

30

<400> 24

ctatgacctg gaggctgca gcatgggctg tgtctc 36

<210> 25

35 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 25

5 gagacacagc ccatgctgca gcactccagg tcatag 36

<210> 26

<211> 35

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

15 <400> 26

ccccgggcat ggtctgcat gagaacagat gtgtg 35

<210> 27

<211> 35

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

25 <400> 27

cacacatctg ttctatggc agaccatgcc cgggg 35

<210> 28

30 <211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 28

gggcatggtc cgggtgaga acagatgtgt ggcc 34

<210> 29
 <211> 34
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

10 <400> 29
 ggccacacat ctgttctcac accggacat gcc 34

<210> 30
 15 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 30
 tggccctgga aagggttgc tgctccatc agggc 35

25 <210> 31
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 31
 gccctgatgg aagcagcaac accttccag ggcca 35

35 <210> 32
 <211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 32

gaaagggtgc cctgctgcc tcaaggcaag gag 33

10 <210> 33

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 33

ctcctgccc tgatggcagc agggacacct ttc 33

20

<210> 34

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 34

30 cttccatcag ggcaagtgct atgccctgg agaaac 36

<210> 35

<211> 36

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 35
gtttctccag gggcatagca ctgcccctga tggaag 36

5

<210> 36
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 36
15 gggcaaggag tatgcctgtg gagaacacgt gaagatt 37

<210> 37
<211> 37
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis

25 <400> 37
aatcttcaact gtttctccac aggcatactc ctgccc 37

<210> 38
<211> 36
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis

35 <400> 38
cactgtgtc tgcggtgcc ggaagtggaa ctgcac 36

<210> 39
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 39
10 gtgcagttcc acttccggca ccgacagaca caagtg 36

<210> 40
<211> 36
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis

20 <400> 40
ctgtgtctg tcgggactgc aagtggaact gcacag 36

<210> 41
<211> 36
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis

30 <400> 41
ctgtgcagtt ccaactgcag tcccgacaga cacaag 36

<210> 42
35 <211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 42
 5 ctgtcgggac cgggtgctgga actgcacaga ccatg 35

<210> 43
 <211> 35
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

15 <400> 43
 catggtctgt gcagtccag caccggtccc gacag 35

<210> 44
 <211> 35
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

25 <400> 44
 ctgtcgggac cggaagtgca actgcacaga ccatg 35

<210> 45
 30 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 45

catggtctgt gcagttgcac tccggtccc gacag 35

<210> 46
<211> 38
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis
10

<400> 46
ccactacctc accttctgcg ggctcaaata cctgttc 38

<210> 47
15 <211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 47
ggaacaggtg tttgagcccg cagaaggtga ggtagtgg 38

25 <210> 48
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 48
35 cctcagtgaa atgcaagaaa tgcgtcacca tcttggtg 39

<210> 49
<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 49

ccaccaggat ggtgacgcat ttctgcatt tcaactgagg 39

10 <210> 50

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 50

ctgccataac aacatcatga agtgcacgat ggtggattcc tctg 45

20

<210> 51

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 51

30 caggaggaat ccaccatcgt gcacttcatg atgttggtat ggcag 45

<210> 52

<211> 40

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 657 291 T3

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 52

caacaagctg gtggaccct gcccatatct ggatgtctgc 40

5

<210> 53

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 53

15 gcagacatcc agatatgggc aggggtccac cagcttgttg 40

<210> 54

<211> 35

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

25

<400> 54

gccagggacc cttgtagcc tatcctgtcg gcccc 35

<210> 55

<211> 35

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

35

<400> 55

ggggccgaca ggataggcta caaagggtcc ctggc 35

76

<210> 56
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 56
10 gttgctagca tggaaataga gctctccac 29

<210> 57
<211> 30
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 57
20 cacgcgccg cttagtagag gtcctgtgcc 30

<210> 58
<211> 44
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis
30

<400> 58
ctactcttca gtcattgcaa gaggaaattg actatgatga tacc 44

<210> 59
35 <211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 59

5 ggtatcatca tagtcaattt cctcttgaca tgactgaaga gtag 44

<210> 60

<211> 46

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

15 <400> 60

cagtcagatc aagaggaaat ttgctatgat gataccatat cagttg 46

<210> 61

<211> 46

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

25

<400> 61

caactgatat ggtatcatca tagcaaattt cctcttgatc tgactg 46

<210> 62

30 <211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 62

gatcaagagg aaattgactg tgatgatacc atatcagttg aaatg 45

<210> 63
<211> 45

5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis

10 <400> 63
cattcaact gatatggtat catcacagtc aatttctct tgatc 45

<210> 64

15 <211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis

20 <400> 64
gatcaagagg aaattgacta ttgtgatacc atatcagttg aaatgaagaa gg 52

25 <210> 65
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 65
ccttctcat ttaactgat atggtatcac aatagtcaat ttctcttga tc 52

35 <210> 66
<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 66

gatcaagagg aaattgacta tgattgtacc atatcagttg aatgaagaa gg 52

10 <210> 67

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 67

ccttctcat tcaactgat atgtacaat catagtcaat ttctcttga tc 52

20

<210> 68

<211> 56

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 68

30 tgactatgat gataccatat cagtttgcag gaagaaggaa gattttgaca tttatg 56

<210> 69

<211> 56

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 69
cataaatgtc aaaatcttcc ttctcatgc aaactgatat ggtatcatca tagtca 56

5

<210> 70
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 70
gatgatacca tatcagttga aatgaagaag tgcgatttg acatttatga tgagg 55

15

<210> 71
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 71
cctcatcata aatgcaaaa tcgcacttct tcattcaac tgatagga tcatc 55

25

<210> 72
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 72
gataccatat cagtgaaat gaagaaggaa tgtttgaca ttatgatga ggatg 55

35

<210> 73

<211> 55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 73

10 catcctcatc ataaatgtca aaacattcct tctcatttc aactgatatg gtatc 55

<210> 74

<211> 53

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

20 <400> 74

gaaatgaaga aggaagattt ttgcatttat gatgaggatg aaaatcagag ccc 53

<210> 75

<211> 53

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

30

<400> 75

gggctctgat ttcatcctc atcataaatg caaaaatctt ccttctcat ttc 53

<210> 76

35 <211> 53

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 76

5 gaaatgaaga aggaagattt tgactgttat gatgaggatg aaaatcagag ccc 53

<210> 77

<211> 53

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

15 <400> 77

gggctctgat ttcatcctc atcataacag tcaaaatctt ccttctcat ttc 53

<210> 78

<211> 47

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

25

<400> 78

gaagaaggaa gatttgaca ttgcatga ggatgaaaat cagagcc 47

<210> 79

30 <211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 79

ES 2 657 291 T3

ggctctgatt ttcacacctca tcgcaaatgt caaaatcttc ctcttc 47

<210> 80

<211> 48

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para mutagénesis

10

<400> 80

ggaagatttt gacatttatg attgcatga aaatcagagc cccgcag 48

<210> 81

15 <211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido para mutagénesis

<400> 81

ctgcgggggc tctgatttc atcgcaatca taaatgcaa aatcttc 48

25 <210> 82

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador de PCR

<400> 82

gtggctagcg catggaaata gagctctcca c 31

35

<210> 83

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador de PCR

<400> 83

cacgcggccg cgttaccggt gtagagggtcc tgtgcctcgc 40

10 <210> 84

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador de PCR

<400> 84

gtgaccggtg actccacagt gagctgtccc 30

20

<210> 85

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 85

30 acagcggccg ctatcacttg ctgcacttcc tgg 33

<210> 86

<211> 29

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 657 291 T3

<223> Cebador de PCR

<400> 86

gtgaccgggtt gcaacgacat cactgccag 29

5

<210> 87

<211> 75

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de ADNc (sitio de escisión por trombina)

<400> 87

15

accggtgatg acaactctcc ttcctttatc caaattcgct cagttgcaa gaagcctcct 60

aaaacttgga ccggt 75

<210> 88

<211> 93

20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADNc (sitio de escisión por trombina)

25

<400> 88

accggtgatg aggatgaaaa tcagagcccc cgcagctttc aaaagaaaac acgacactat 60

tttattgctg cagtgagag gctctggacc ggt 93

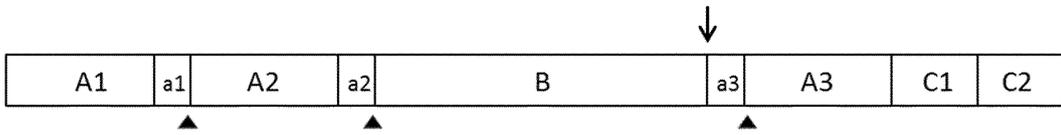
REIVINDICACIONES

1. Un complejo covalente de factor de von Willebrand (VWF) o variantes del mismo y variantes del factor VIII, que comprende un resto que prolonga la semivida, a condición de que dichas variantes del factor VIII retengan al menos el 10 % de la actividad biológica de FVIII no mutado,
- 5 en el que el factor VIII se modifica de manera que forme un puente disulfuro con VWF, por lo que el factor VIII se modifica por sustitución de un aminoácido que existe de forma natural con un resto de cisteína o la inserción de un resto de cisteína que forma un puente disulfuro con un resto de cisteína en el factor de von Willebrand.
2. El complejo de la reivindicación 1, en el que el aminoácido que existe de forma natural que está sustituido en el factor VIII está seleccionado de un aminoácido en el dominio a3.
- 10 3. El complejo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el aminoácido que existe de forma natural es un resto ácido, o un resto implicado en un fenotipo hemófilo, o un resto de Tyr sulfatado en el dominio a3 del factor VIII.
4. El complejo de la reivindicación 1, en el que el aminoácido que existe de forma natural que está sustituido en el factor VIII está en el dominio de extremo C.
- 15 5. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el factor de von Willebrand se modifica por sustitución de un aminoácido que existe de forma natural con un resto de cisteína o la inserción de un resto de cisteína que forma un puente disulfuro con un resto de cisteína introducido en el factor VIII.
6. El complejo de la reivindicación 5, en el que el aminoácido que existe de forma natural en el factor de von Willebrand es un aminoácido en la región D' o D3.
- 20 7. El complejo de la reivindicación 6, en el que el aminoácido que existe de forma natural en el factor de von Willebrand es un resto básico en la región D' o D3 o un resto altamente conservado en la región D' o un resto implicado en la enfermedad de von Willebrand de tipo N.
8. El complejo de la reivindicación 1, en el que el factor VIII se modifica para comprender uno o más dominios de VWF.
- 25 9. El complejo de la reivindicación 8, en el que el factor VIII se modifica para comprender el dominio CK del extremo C de VWF.
10. El complejo de la reivindicación 9, en el que el factor VIII se modifica para también comprender dominios de VWF C6, o C5 y C6, C3 a C6, o uno cualquiera o más de los dominios C1 a C6, o variantes de los mismos, a condición de que las variantes retengan al menos el 10 % de la actividad biológica del (de los) dominio(s) de VWF respectivo(s).
- 30 11. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el factor VIII comprende los restos 2724 a 2812 de SEQ ID NO: 2 o una variante de los mismos, a condición de que el resto de cisteína 2773 (o equivalente del mismo) se preserve y a condición de que la variante retenga al menos el 10 % de la actividad respectiva.
12. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el dominio de VWF de extremo C está unido a FVIII por un conector escindible.
- 35 13. El complejo de la reivindicación 12, en el que el conector escindible comprende uno de los sitios de escisión por trombina de FVIII.
14. El complejo de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que la secuencia conectora comprende restos de aminoácidos adicionales que proporcionan un péptido de longitud suficiente para permitir la interacción intramolecular de FVIII y VWF mediante las regiones a3 y D'D3, respectivamente.
- 40 15. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el que el factor VIII se modifica en su extremo C o en su extremo N, o dentro de, o sustituyendo parcialmente o completamente, el dominio B de FVIII.
16. El complejo de la reivindicación 8 o la reivindicación 15, en el que el factor VIII se modifica para comprender la región D'D3 de VWF o fragmentos de la misma.
17. El complejo de la reivindicación 16, en el que el factor VIII se modifica reemplazando su dominio B parcialmente o completamente por la región D'D3 de VWF o fragmentos o variantes de la misma.
- 45 18. El complejo de la reivindicación 17, en el que el factor VIII comprende dentro de su dominio B o en lugar de su dominio B o en lugar de parte de su dominio B los restos 746 a 1241 de SEQ ID NO: 2 o variantes o fragmentos de la misma, a condición de que se retenga al menos el 10 % de la actividad biológica.
19. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el FVIII se expresa como una molécula de dos cadenas representando la región de D'D3 de VWF el extremo amino de la cadena ligera de FVIII.

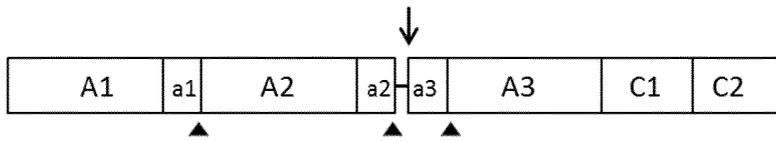
20. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que una secuencia de conector adicional se introduce entre la región D'D3 de VWF y los dominios de cadena ligera de FVIII.
21. El complejo de cualquier reivindicación previa, en el que el factor VIII es un factor VIII genéticamente manipulado.
- 5 22. El complejo de la reivindicación 11, en el que el factor VIII manipulado tiene una delección del dominio B completa o parcial, es un factor VIII mutado, o un polipéptido de fusión con un resto que prolonga la semivida.
23. El complejo de cualquiera reivindicación previa, en el que VWF es una forma de semivida prolongada de VWF.
24. El complejo de la reivindicación 23, en el que la forma de semivida prolongada de VWF es una proteína de fusión de VWF genéticamente manipulada con un resto que prolonga la semivida.
- 10 25. El complejo de la reivindicación 22 o la reivindicación 24, en el que el resto que prolonga la semivida está seleccionado de albúmina o variantes o fragmentos de la misma, región constante de inmunoglobulina y porciones y variantes de la misma, por ejemplo el fragmento Fc o variantes del mismo, cadenas al azar solvatadas con volumen hidrodinámico grande (por ejemplo, XTEN o PAS), afamina o variantes de la misma, alfa-fetoproteína o variantes de la misma, proteína de unión a vitamina D o variantes de la misma, transferrina o variantes de la misma, polipéptidos o lípidos capaces de unirse en condiciones fisiológicas a albúmina o regiones constantes de inmunoglobulina.
- 15 26. El complejo de la reivindicación 1 o la reivindicación 23, en el que la semivida en plasma de VWF se prolonga por modificación química, por ejemplo unión de polietilenglicol (PEGilación), PEG glucosilado, hidroxietilalmidón (HESilación), ácidos polisilícicos, polímeros de heparosán, polipéptido de tipo elastina o ácido hialurónico.
- 20 27. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en el que el VWF se expresa como un monómero o en el que el VWF se expresa como un dímero.
28. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en el que el VWF forma un multímero.
29. El complejo de la reivindicación 1 o la reivindicación 26, en el que el enlace covalente se obtiene por uso de uno o más reticulantes químicamente sintetizados.
- 25 30. Un método de producción del complejo covalente de factor VIII y VWF de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, que comprende co-expresar el factor FVIII y VWF en una línea celular eucariota.
31. Un complejo covalente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un trastorno de hemorragia.
32. El complejo de la reivindicación 31, en el que el trastorno de hemorragia es hemofilia A o enfermedad de von Willebrand.
- 30 33. Una composición farmacéutica que comprende el complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29.

Figura 1

a)



b)



c)

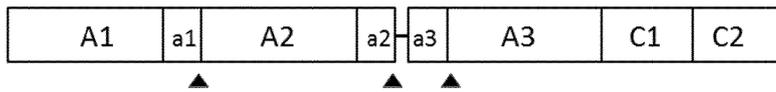
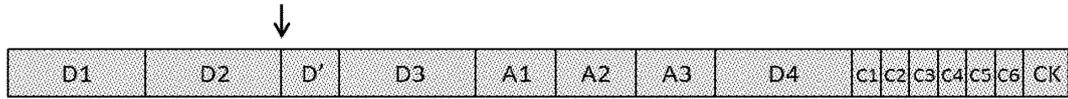


Figura 2

a)



b)

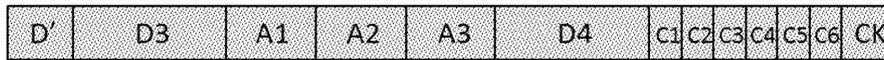


Figura 3:

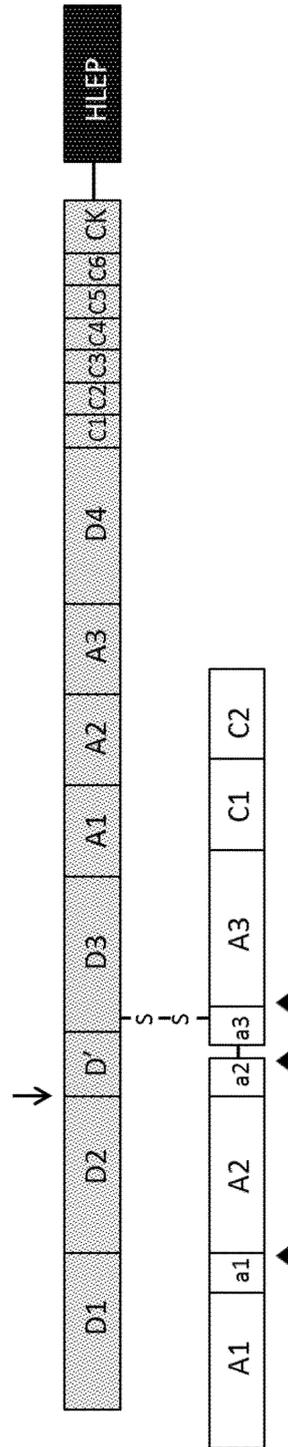
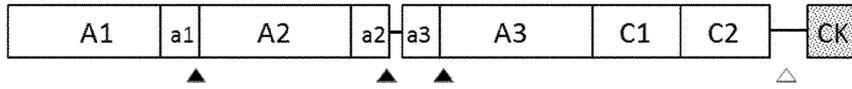
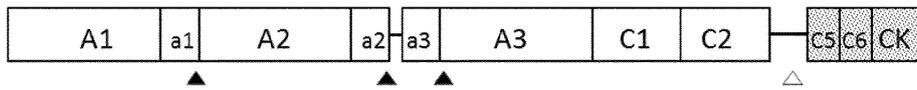


Figura 4

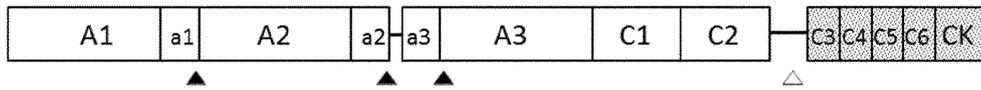
a)



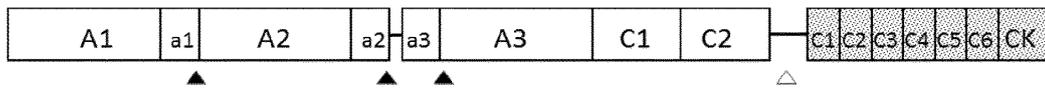
b)



c)



d)



e)

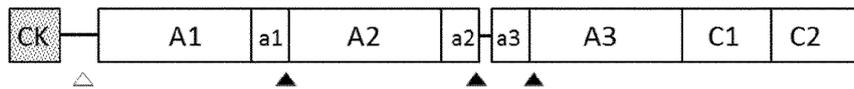
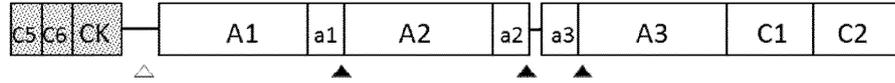
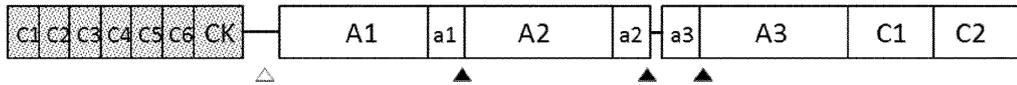


Figura 4 continuación

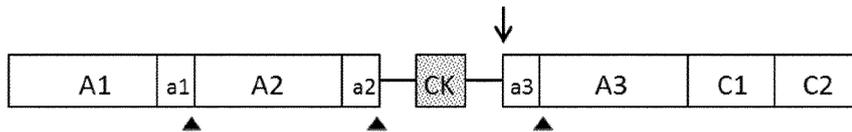
f)



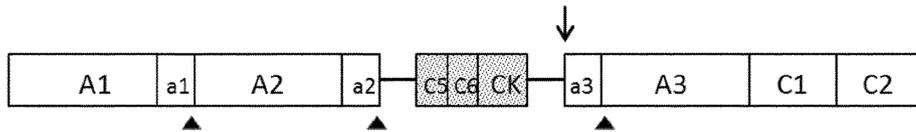
g)



h)



i)



j)

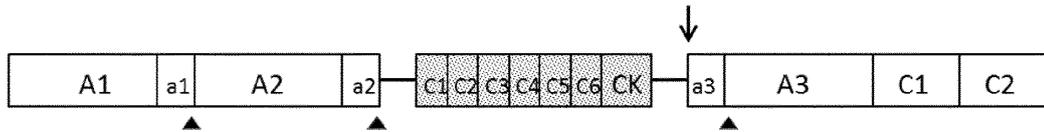


Figura 5 (FVIII modificado por uno o más dominios D de VWF)

a)

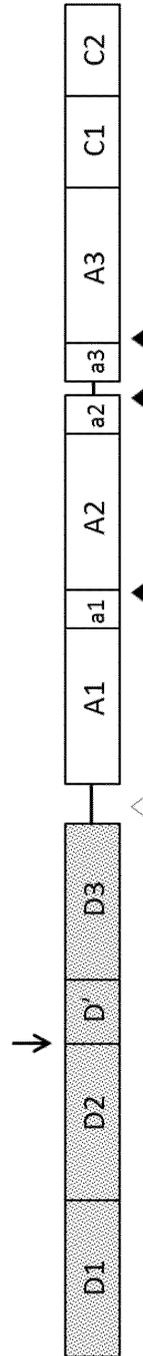


Figura 5 continuación

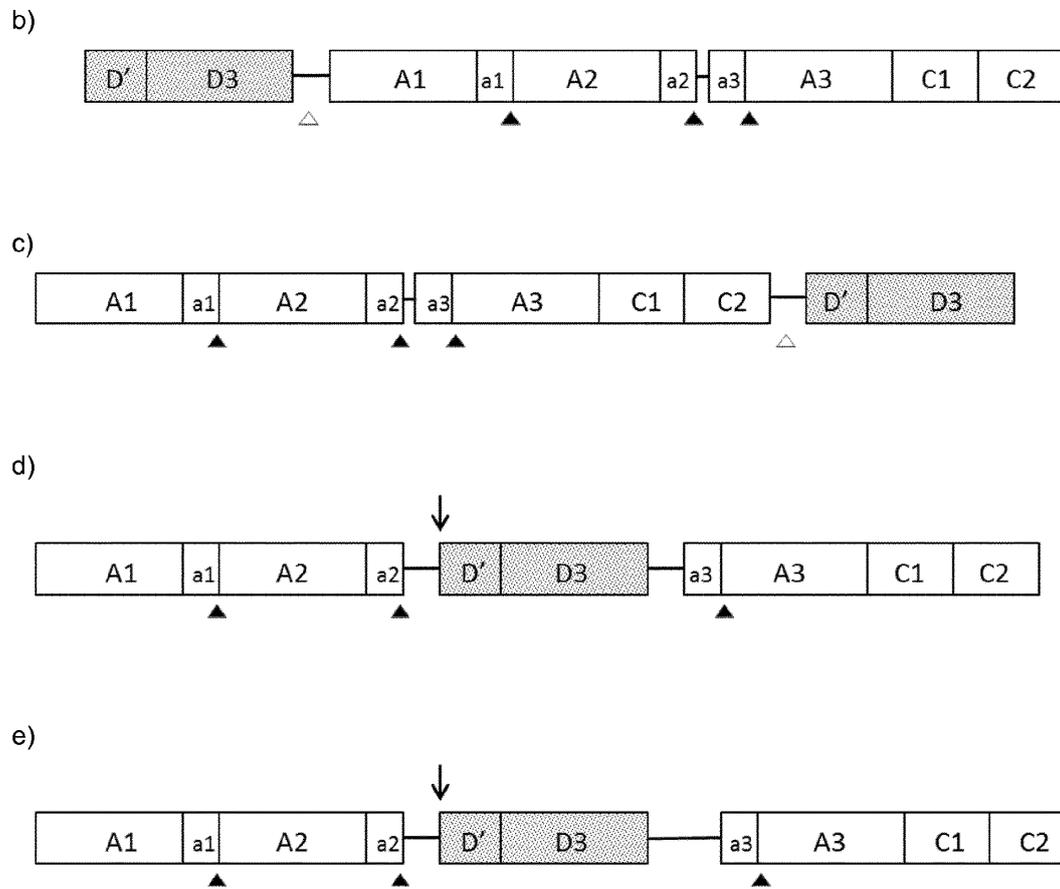


Figura 6: FVIII modificado por dominios de VWF adicionales

a)

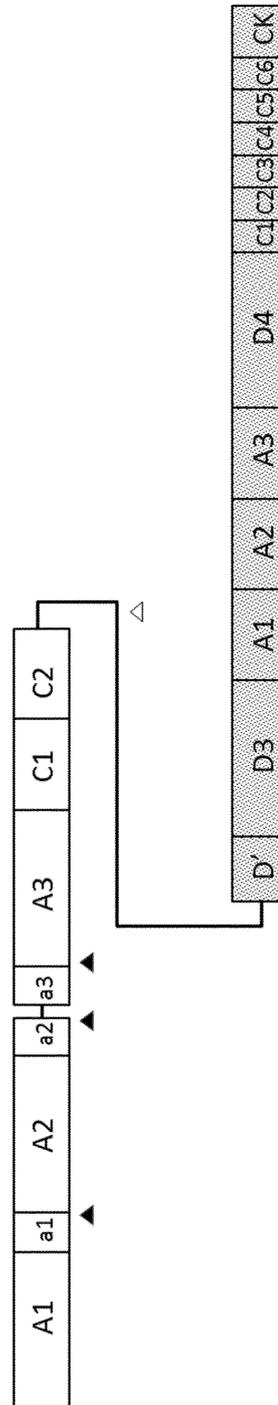


Figura 6 continuación

b)

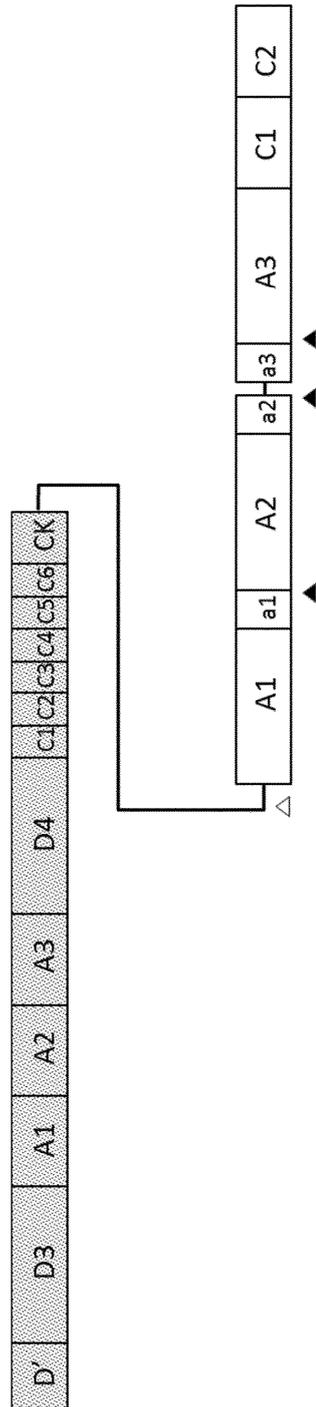


Figura 6 continuación

c)

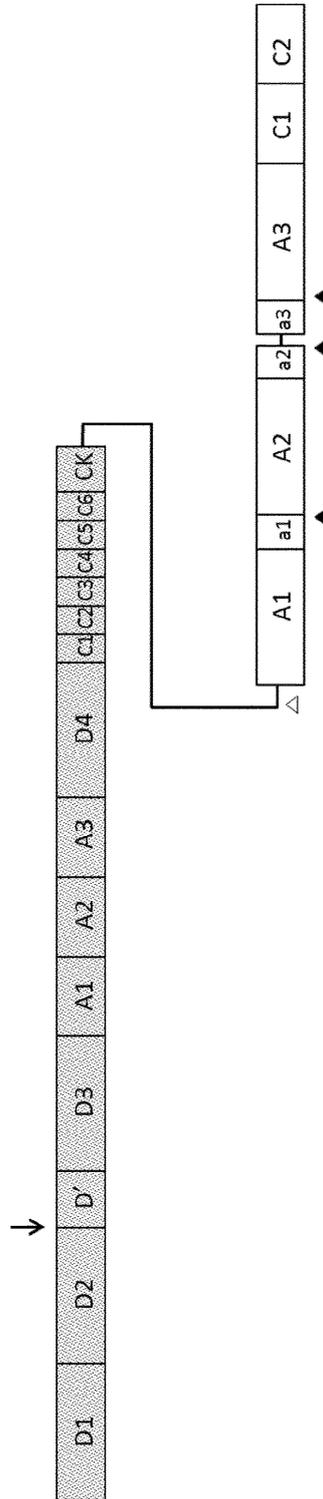


Figura 7

