(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 676 874**

(51) Int. CI.:

C07K 14/79 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2011 PCT/KR2011/004131**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO11152694**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2011 E 11790052 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2576625**

(54) Título: **Proteína de fusión que tiene actividad del factor VII**

(30) Prioridad:

04.06.2010 KR 20100052719

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2018

(73) Titular/es:

TIUMBIO CO., LTD. (100.0%)
5th Floor, 310 Pangyo-ro, Bundang-gu
Seongnam-si, Gyeonggi-do 13494, KR

(72) Inventor/es:

SONG, IN-YOUNG;
KIM, HUN-TAEK;
LEE, BONG-YONG;
PARK, MAHN-HOON;
LEE, HO-SOON;
LIM, YUN JUNG;
LEE, JI-HYE;
SON, SEO YEON y
KIM, MIN-SUN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Proteína de fusión que tiene actividad del factor VII

Campo técnico

La presente invención se refiere a una proteína de fusión que tiene actividad del factor VII (FVII); y, más particularmente, a una proteína de fusión que comprende FVII y transferrina y que tiene 0,7 o más de la actividad específica del FVII en comparación con el FVII de tipo natural no fusionado, un ADN que lo codifica, un vector recombinante que comprende en ADN y una célula hospedadora que comprende el vector recombinante.

Antecedentes de la técnica

Diversos trastornos hemorrágicos están provocados por la falta de factores de coagulación sanguínea. Los trastornos más comunes son la hemofilia A y B provocada por deficiencias o anomalía de los factores de coagulación sanguínea VIII y IX, respectivamente.

La hemofilia A es un trastorno hemorrágico genético provocado por un rasgo recesivo ligado al cromosoma X de un gen del factor VIII defectuoso. Se ha usado un concentrado de un factor VIII procedente de plasma o recombinante para el tratamiento de la hemofilia A. La hemofilia B está provocada por una deficiencia o disfunción del factor IX, que se trata usando un concentrado de factor IX procedente de plasma o recombinante. Sin embargo, la aparición de aloanticuerpos contra los factores de reemplazo sigue siendo un problema médico grave en el tratamiento de la hemofilia A y B. Se generan anticuerpos contra el factor VIII en hasta el 30 % de los pacientes con hemofilia A. Aunque se producen menos anticuerpos contra el factor IX, estos son menos sensibles a una terapia de inducción de tolerancia inmunitaria, lo que conduce a resultados más graves.

La coagulación sanguínea se inicia por la formación de un complejo entre el factor tisular expuesto a sangre en circulación después del daño de una pared vascular y una forma activada del factor VII (FVIIa). Dicho complejo activa el factor IX y el factor X y el factor Xa resultante produce la cantidad limitada de trombina. En un bucle de retroalimentación positiva, la trombina activa diversos factores (tales como factor VIII, factor V, factor XI, etc.) de cascada de coagulación sanguínea y los factores activados constituyen un complejo de factor Xasa o un complejo de protrombinasa. Estos complejos amplifican adicionalmente su propia generación y la producción de trombina. Esta cantidad suficiente de trombina denominada "estallido de trombina" convierte fibrinógeno en sitios de hemorragia en fibrina, consiguiendo de este modo hemostasia completa. Sin embargo, en caso de enfermos de hemofilia que tienen una alta concentración de anticuerpos neutralizantes contra el factor VIII o el factor IX, no se consigue hemostasia suficiente ya que no pueden producirse los complejos de factor Xasa mencionados anteriormente. Se ha usado FVIIa como un producto terapéutico importante para los pacientes que tienen anticuerpos neutralizantes contra el factor VIII o el factor IX, debido a que puede activar el factor X, incluso en ausencia del factor VIII y el factor IX, produciendo de este modo en última instancia una cantidad suficiente de trombina para conseguir los efectos terapéuticos deseados.

El FVII es una glucoproteína monocatenaria que consiste en 406 aminoácidos, tiene un peso molecular de 50 kDa y se secreta al torrente sanguíneo como un zimógeno. El FVII consiste en cuatro dominios distintos, es decir, un dominio de ácido carboxiglutámico (Gla) amino terminal, dos dominios de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) y un dominio de serina proteasa (Hagen FS *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83(8):2412-2416, 1986). El FVII se convierte en su forma activada, FVIIa, formando dos cadenas polipeptídicas unidas por un enlace disulfuro, es decir, cadena ligera N terminal (24 kDa) y cadena pesada C terminal (28 kDa) mediante la proteólisis de un único enlace peptídico localizado en Arg 152-Ile 153. FVII está presente a una concentración de 500 ng/ml en plasma y 1 % (es decir, 5 ng/ml) de FVII está presente como FVIIa.

Al mismo tiempo, se ha indicado que la semivida de FVII en plasma es de aproximadamente 4 horas (3~6 horas), mientras que la de FVIIa es de aproximadamente 2,5. Debido a la corta semivida, es necesario administrar FVIIa mediante múltiples inyecciones intravenosas o inyección continua. Sin embargo, esto limitaría los usos terapéuticos de FVIIa con respecto a altos gastos de tratamiento y a la incomodidad del paciente.

Para solucionar estos problemas, se han proporcionado métodos para preparar proteínas de fusión que comprenden FVII y un compañero de fusión unido al mismo, pero las proteínas resultantes tuvieron el problema de perder sus actividades biológicas, incluso aunque la semivida *in vivo* corta mejoró en cierta medida en comparación con la proteína no fusionada.

En consecuencia, existe la necesidad de proporcionar y obtener una proteína de fusión de FVII que tenga una semivida *in vivo* mejorada que conserve al mismo tiempo la actividad biológica del FVII de tipo natural.

Divulgación de la invención

Problema técnico

Es un objeto de la presente invención proporcionar una proteína de fusión que tenga la actividad biológica del FVII de tipo natural.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un gen que codifique la proteína de fusión.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un vector recombinante que comprenda el gen.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar una célula hospedadora que comprenda el vector recombinante.

Solución al problema

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína de fusión que comprende factor VII (FVII) y transferrina, en la que la transferrina se une con el extremo C del FVII, en la que dicha proteína de fusión comprende además un enlazador entre el FVII y la transferrina, en la que dicho FVII es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 95 % de homología con un polipéptido representado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en la que dicha transferrina es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 95 % de homología con un polipéptido representado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un ADN que codifica la proteína de fusión.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un vector recombinante que comprende el ADN.

De acuerdo con un otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una célula hospedadora que comprende el vector recombinante.

Efectos ventajosos de la invención

La proteína de fusión según la presente invención tiene una semivida *in vivo* mejorada en comparación con el FVII de tipo natural conservando al mismo tiempo una alta actividad biológica de FVII y por lo tanto puede emplearse eficazmente en la terapia que usa FVII.

Breve descripción de los dibujos

Los anteriores y otros objetos y características de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención, cuando se tome junto con los dibujos adjuntos, que muestran respectivamente:

la Fig. 1 es un diagrama esquemático que muestra un procedimiento de clonación para construir un vector de expresión de FVII-Tf a partir de un vector que comprende un ADNc que codifica la secuencia de FVII y un vector que comprende un ADNc que codifica la secuencia de transferrina (Tf);
la Fig. 2 es un diagrama esquemático que muestra un procedimiento para construir un vector de expresión de FVII-GS1 (enlazador)-Tf mediante PCR solapante;
la Fig. 3 es un diagrama esquemático que muestra un procedimiento de construcción de vectores de expresión de FVII-enlazador de GS-Tf que comprenden GS3, GS5, GS7, GS9, GS11, GS13, GS15 o GS-l-T como un enlazador;
la Fig. 4 presenta resultados de transferencia de Western de proteínas de fusión de VII-Tf, FVII-GS1-Tf, FVII-GS3-Tf, FVII-GS5-Tf, FVII-GS7-Tf, FVII-GS9-Tf, FVII-GS11-Tf, FVII-GS13-Tf, FVII-GS15-Tf, FVII-GS1-T-Tf y FVII-Hélice-Tf de la presente invención, proteína de fusión de FVII-albúmina (FVII-Alb) y FVII (NovoSeven^{TM});
la Fig. 5 es un gráfico que muestra actividades específicas de proteínas de fusión de FVII-Tf, FVII-GS1-Tf, FVII-GS3-Tf, FVII-GS5-Tf, FVII-GS7-Tf, FVII-GS9-Tf, FVII-GS11-Tf, FVII-GS13-Tf, FVII-GS15-Tf, FVII-GS1-T-Tf y FVII-Hélice-Tf, y proteína de fusión de FVII-albúmina (FVII-Alb);
la Fig. 6 presenta la estructura de un enlazador y secuencias de reconocimiento de restricción en ambos extremos en la proteína de fusión de FVII-GS1-T-Tf; y
la Fig. 7 muestra resultados de transferencia de Western de proteínas de fusión de FVII-Tf, FVII-GS1-Tf, FVII-GS1-T-Tf, FVII-GS3-Tf y FVII-GS15-Tf purificadas de la presente invención, NovoSeven^{TM} y FVII.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

La presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende factor VII (FVII) y transferrina, en la que dicha transferrina se une con el extremo C de dicho FVII, en la que dicha proteína de fusión comprende además un enlazador entre el FVII y la transferrina, en la que dicho FVII es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos

con al menos 95 % de homología con un polipéptido representado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en la que dicha transferrina es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 95 % de homología con un polipéptido representado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Más preferentemente, FVII tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y transferrina tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

FVII o transferrina usados en la proteína de fusión de la presente invención pueden ser un equivalente funcional o un derivado funcional de tipo natural del mismo que tiene una actividad funcional sustancialmente equivalente, siempre que satisfaga los requisitos de identidad de secuencia descritos anteriormente en el presente documento. Los equivalentes funcionales ejemplares incluyen mutantes inducidos por supresión, inserción o sustitución no conservativa o conservativa de cualquier resto de aminoácido, o una combinación de las mismas en secuencia de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente, en las que dichos cambios no alteran sustancialmente los sitios o dominios activos que proporcionan actividades biológicas a FVII.

En algunos casos, la proteína de fusión de la presente invención puede modificarse, por ejemplo, mediante fosforilación, sulfatación, acrilación, glucosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación y otras, para la mejora o reducción de sus propiedades físicas o químicas y dichos derivados funcionales también quedan dentro del alcance de la presente invención siempre que la actividad biológica de FVII se conserve sustancialmente.

En la proteína de fusión de la presente invención, la transferrina se une con el extremo C del FVII. La proteína de fusión en el orden de FVII-transferrina es superior a una proteína de fusión en el orden de transferrina-FVII, probablemente debido a la exposición del extremo N del FVII (véase tabla 3).

La proteína de fusión de la presente invención puede comprender además secuencia o secuencias de reconocimiento para una enzima de restricción entre FVII y transferrina para facilitar la inserción de un enlazador como se describe posteriormente. La secuencia de reconocimiento de restricción puede ser cualquier secuencia de reconocimiento de restricción conocida por un experto habitual en la materia y puede usarse preferentemente secuencia de reconocimiento de *Age*I (A/CCGGT). En otras palabras, las proteínas de fusión, en las que la secuencia de reconocimiento de restricción está unida al extremo C de FVII y la transferrina está unida a la secuencia de reconocimiento de restricción, están incluidas dentro del alcance de la presente invención.

La presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende un enlazador entre FVII y transferrina.

El enlazador puede tener de 1 a 100 aminoácidos, preferentemente de 1 a 75 aminoácidos, más preferentemente de 5 a 25 aminoácidos y puede ser cualquier péptido que pueda separar funcionalmente FVII y transferrina. El enlazador puede tener una estructura secundaria estable tal como una hélice u originarse de una región bisagra de IgG. Preferentemente, el enlazador puede rotar libremente en solución acuosa y no tiene una estructura fija y, por lo tanto, no sería inmunogénico y aumentaría las actividades de FVII de proteínas de fusión minimizando la interferencia potencial entre dos compañeros de fusión. Como ejemplo, dicho enlazador puede ser un enlazador helicoidal representado por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. Además, dicho enlazador flexible puede contener glicina (G) y serina (S) en un patrón repetido o aleatorio. Por ejemplo, el enlazador comprende $(GGGGS)_N$ (en el que N es un número entero comprendido entre 1 y 20) y preferentemente tiene una cualquiera del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 11 (véase tabla 1). Además, puede usarse también cualquier secuencia de aminoácidos que no tenga menos del 80 % de homologías con el enlazador, preferentemente que no tenga menos del 85 % de homologías en la proteína de fusión de la presente invención.

Asimismo, el enlazador también puede incluir sitio o sitios de escisión de proteasa que son reconocidos por proteasa o proteasas en un tejido no lesionado. El sitio de escisión puede escindirse mediante una proteasa seleccionada entre el grupo que consiste en trombina, factor Xa, factor IXa y factor VIIa. La proteína de fusión que tiene dicho sitio de escisión de proteasa se escinde en el sitio de trabajo para producir cada proteína, es decir, FVII y transferrina, y las proteínas resultantes actúan como proteínas individuales. Preferentemente, el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 (véase tabla 1).

El enlazador puede insertarse en una proteína de fusión más fácilmente mediante la secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción que se localiza entre FVII y transferrina. En consecuencia, la secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción puede estar presente en un extremo cualquiera o ambos extremos del enlazador y traducirse a su vez en aminoácidos codificados por la secuencia. Por ejemplo, cuando se usa la secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción de *Age*I, Thr puede estar presente en el extremo N del enlazador y Thr-Gly puede estar presente en el extremo C del enlazador. Es decir, cuando se usa un enlazador $(GGGGS)_3$, la secuencia de reconocimiento y el enlazador pueden estar presentes en una forma de --$T(GGGGS)_3TG$--. Los aminoácidos traducidos en los extremos N y C del enlazador pueden variar dependiendo de la secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción empleada, pero la presencia de la misma no influye en las actividades de las proteínas de fusión (véase tabla 5).

La proteína de fusión de la presente invención no muestra menos de 0,7 de la actividad específica del FVII en comparación con el FVII de tipo natural no fusionado.

En un aspecto de la presente invención, la proteína de fusión, que comprende FVII representado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y transferrina representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, tiene de aproximadamente 0,82 a aproximadamente 0,92 de la actividad específica de FVII en comparación con el FVII de tipo natural no fusionado (véase tablas 2 y 3).

Además, la proteína de fusión, que comprende FVII representado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, el enlazador representado la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 y transferrina representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, tiene aproximadamente 0,97 de la actividad específica de FVII en comparación con el FVII de tipo natural no fusionado (véase tabla 2).

Las proteínas de fusión según la presente invención, en las que se insertan otros enlazadores entre FVII y transferrina, también tienen de aproximadamente 0,74 a aproximadamente 1 de las actividades específicas de FVII en comparación con el FVII de tipo natural no fusionado (véase tabla 2).

Asimismo, la proteína de fusión de la presente invención tiene una semivida 3~4 veces más larga que la de FVII sin transferrina unida al mismo (véase tabla 6).

La presente invención también proporciona un ADN que codifica la proteína de fusión.

El ADN que codifica la proteína de fusión puede someterse a diversos cambios y modificaciones debidos a la degradación del codón o teniendo en cuenta los codones preferidos en el organismo para expresar la proteína de fusión, a no ser que la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión se altere sustancialmente, y los ADN modificados también se incluyen en el alcance de la presente invención. En la presente invención, el ADN que codifica la proteína de fusión puede representarse preferentemente mediante una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 13 a 24. El ADN que codifica la proteína de fusión de la presente invención puede ser proporcionado por un vector para expresar el ADN.

La presente invención proporciona un vector recombinante que comprende el ADN que codifica la proteína de fusión.

El término "vector" usado en el presente documento se refiere a un medio para introducir un ADN que codifica dicha proteína de fusión en una célula hospedadora y expresar la proteína de fusión en la misma. El vector puede incluir todos los vectores convencionales tales como vectores plasmídicos, vectores cosmídicos, vectores de bacteriófagos, vectores víricos y otros, preferentemente un vector plasmídico.

Un vector de expresión adecuado contiene elementos reguladores de la expresión tales como promotores, codones de inicio, codones de terminación, señales de poliadenilación y potenciadores, así como secuencias de señal o secuencias líder para dirección a membrana o secreción y puede prepararse de forma diversa según los fines. El codón de inicio y codón de terminación deberían actuar con seguridad en un organismo en el que se administra la construcción génica y deberían estar en fase con la secuencia codificante. Además, el vector de expresión contiene un marcador selectivo para seleccionar una célula hospedadora que contiene el vector y un origen de replicación si el vector de expresión es reproducible. El vector puede autorreplicarse o integrarse en el ADN de una célula hospedadora.

Específicamente, el vector de expresión recombinante según la presente invención puede prepararse insertando un ADN que codifica la secuencia de proteína de fusión en el vector pcDNA3.1-hygro.

Además, la presente invención proporciona una célula hospedadora que produce la proteína de fusión por transformación con dicho vector de expresión recombinante.

Ya que los niveles de expresión y modificaciones de las proteínas varían dependiendo del tipo de células hospedadoras, se prefiere elegir una célula hospedadora más adecuada para el fin. Los ejemplos de células hospedadoras incluyen células de mamífero, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (HEK293), células de riñón de hámster (BHK 21), células de cáncer de hígado humano (Hep G2) y otros, pero no están limitados a los mismos.

Para transformar una célula hospedadora con el vector de expresión recombinante según la presente invención, puede emplearse cualquier método conocido por los expertos habituales en la materia y el ejemplo de dicho método incluye, pero sin limitación, electroporación, fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio ($CaPO_4$), precipitación con cloruro de calcio ($CaCl_2$) y otros.

Modo para la invención

Los ejemplos siguientes se proporcionan con fines ilustrativos únicamente y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de vector plasmídico del factor VII (FVII) (pcDNA3.1-hygro-FVII)

Se usó ARN total purificado a partir de células Hep G2 (KCLB N.º 88065) como un molde para transcripción inversa. El transcrito de ADN complementario (ADNc) se amplificó mediante PCR usando cebadores específicos del gen del FVII, FVII-F y FVII-R (SEQ ID NO: 25 y 26) para obtener la fase abierta de lectura del gen del FVII humano. La PCR se realizó tratando 50 µl de solución de reacción (0,5 µl de ADNc, 0,4 µM (10 pmol/µl) de cebadores de las SEQ ID NO: 25 y 26, 0,2 mM de dNTP, 5 unidades de ADN polimerasa Taq y agua) en la siguiente condición: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 5 min, 35 ciclos de amplificación a 94 °C durante 1 min, a 60 °C durante 1 min y a 72 °C durante 2,5 min y 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 min. El producto de PCR purificado se clonó en el vector pGEM-T easy (Promega, Cat n.º: A1360). Los clones positivos se seleccionaron por digestión de restricción usando *Eco*RI y *Nco*I. Los clones seleccionados se verificaron adicionalmente por secuenciación de ADN. Para transferir la ORF del FVII (FVII-ORF) a un vector de expresión, FVII-ORF escindido con *Not*I se hizo romo mediante ADN polimerasa T4 y se ligó con el vector pcDNA3.1-hygro (Invitrogen) digerido con *Hind*III/*Xba*I y se hizo romo. El vector ligado se confirmó mediante digestión de restricción con *Apa*I, *Xba*I, *Eco*RI, *Nco*I, *Rst* I y secuenciación de ADN. Este vector se designó 'pcDNA3.1-hygro-FVII'.

Ejemplo 2: Construcción del vector de expresión de FVII-Tf (pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf)

Se fusionó ADNc del FVII preparado en el ejemplo 1 con ADNc de transferrina humana (Tf) para expresar como un único zimógeno en una célula animal. Se obtuvo ADNc de transferrina humana de Origene (Cat n.º: SC322130) y se verificó si es igual a la secuencia del n.º de referencia de GenBank: NM_001063.2. Los cebadores usados en la fusión se diseñaron para retirar el codón de terminación del FVII y el péptido de señal de la transferrina. Para facilitar la inserción de los diversos tamaños de enlazadores entre el FVII y la Tf, el sitio *Age*I (ACCGGT), que se traducirá a treonina (Thr) y glicina (Gly), se añadió a los cebadores de enlace. La proteína de fusión resultante tendría la siguiente estructura: (péptido líder)-(FVII maduro)-(Thr-Gly)-(Tf madura) (en la que el péptido líder consiste en un péptido de señal (prepéptido) no presente en el FVII maduro y un propéptido para escindir por una enzima de procesamiento, que está compuesta de 38 aminoácidos y corresponde a aminoácidos que varían de las posicione 1 a 38 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1). Los ADNc del FVII y la Tf se amplificaron usando cebadores FVII-S1, FVII-AS1, Tf-S1 y Tf-AS1 (SEQ ID NO: 27 a 30) y se usó el vector como se describe en el ejemplo 1. Los cebadores de las SEQ ID NO: 27 y 30 contienen los sitios *Nhe*I y *Xho*I, respectivamente.

Una estrategia de clonación para la unión de ADNc del FVII y ADNc de la Tf se representa en la Fig. 1. En primer lugar, se amplificó ADNc del FVII a partir del vector pcDNA3.1-hygro-FVII por PCR. La PCR se realizó tratando 50 µl de solución de reacción (1 µl de molde de vector, 1 µl de un conjunto de cebadores, FVII-S1 y FV11-AS1 (10 µM), 10 µl de tampón Phusion HF 5x, 200 µM de dNTP, 0,5 µl de ADN polimerasa Phusion (FINNZYMES, n.º F-530S, 2 unidades/µl) y 35,5 µl de agua) en la siguiente condición: 1 ciclo de desnaturalización a 98 °C durante 30 s, 30 ciclos de amplificación a 98 °C durante 10 s, a 60 °C durante 45 s, y a 72 °C durante 30 s, y 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min.

A continuación, Se amplificó usando ADNc de transferrina como un molde. El procedimiento de PCR anteriormente mencionado se repitió excepto por el uso de un conjunto de cebadores (Tf-S1: 10 µM; Tf-AS1: 10 µM).

El ADNc de FVII y Tf amplificado se unieron por una serie de restricción y ligamiento. Cada ADN amplificado por PCR se digirió con *Age*I y *Xho*I, o con *Nhe*I. Los ADN digeridos se purificaron y se ligaron a una relación molar 1:1. El ADN ligado se subclonó en el vector pcDNA3.1-hygro vector (Invitrogen) digerido con *Nhe*I/*Xho*I. El tamaño y la secuencia del inserto se verificó adicionalmente mediante secuenciación de ADN.

Ejemplo 3: Construcción del vector de expresión FVII-enlazador GS-Tf

Como una unidad de enlazador básica se usó un péptido que consistía en 5 aminoácidos que comprendían glicina y serina. La unidad de enlazador básica comprende cuatro glicinas y una serina con la siguiente secuencia: 'GGGGS'. La unidad de enlazador básica (en lo sucesivo en el presente documento, denominada "enlazador GS-X" en la que X es el número de repeticiones de la unidad de enlazador GS básica) se utilizó para constituir los enlazadores de GS más largos. En este ejemplo, se construyeron los enlazadores que variaban de GS-1 a GS-15.

1) Construcción del vector de expresión FVII-enlazador GS-1-Tf

Se sintetizó un conjunto de cebadores, GS-FV-AS1 y GS-Tf-S1 (SEQ ID NO: 31 y 32), que contenía la unidad de enlazador GS básica y se insertó entre FVII y Tf por PCR solapante (véase Fig. 2).

El enlazador GS-1 se unió a FVII mediante PCR usando un conjunto de cebadores FVII-S1 y GS-FV-AS1 (SEQ ID NO: 27 y 31) y ADN polimerasa Phusion (FINNZYMES, n.º F-530S). La PCR se realizó tratando 50 µl de solución de reacción (1 µl de vector pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf, 1 µl de FVII-S1 (10 pmol/1 µl), 1 µl de GSFV-AS1 (10 pmol/µl), 1 µl de dNTP 10 mM, 10 µl de tampón Phusion HF 5x, 35,5 µl de agua y 0,5 µl de ADN polimerasa Phusion (2 unidades/µl)) en la siguiente condición: 1 ciclo de desnaturalización a 98 °C durante 30 s, 35 ciclos de amplificación a 98 °C durante 10 s, a 64 °C durante 30 s, y a 72 °C durante 45 s, y 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min. Al mismo tiempo,

para conectar el enlazador GS-1 con Tf, se repitió el procedimiento de PCR anterior excepto por el uso de un conjunto de cebadores GS-Tf-Sl y Tf-AS1 (SEQ ID NO: 32 y 30). Los productos de PCR amplificados se utilizaron como moldes de PCR solapante. La PCR solapante se realizó tratando la solución de reacción (1 µl de productos de PCR amplificados, 1 µl de FVII-S1 (10 pmol/µl, SEQ ID NO: 27), 1 µl de cebador antisentido (Tf-AS1 10 pmol/µl, SEQ ID NO: 30), 10 µl de tampón Phusion HF 5x, 1 µl de dNTP 10 mM, 34,5 µl de agua, 0,5 µl de ADN polimerasa Phusion (2 unidades/µl)) en la siguiente condición: 1 ciclo de desnaturalización a 98 °C durante 1 min, 45 ciclos de amplificación a 98 °C durante 10 s, a 66/68 °C durante 30 s, y a 72 °C durante 45 s, y 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min. El producto de PCR solapante amplificado se clonó en pcDNA3.1-hygro-lacZ digerido con *Nhe*I y *Xho*I.

2) Construcción del vector de expresión FVII-enlazador GS-3-Tf

Se sintetizó un conjunto de cebadores, GS3-S y GS3-AS (SEQ ID NO: 33 y 34), que contenían GS-3 y un sitio *Age*I. Para preparar un enlazador bicatenario GS-3, los cebadores se hibridaron calentando una mezcla (5 µl de GS3-S (100 pmol/µl), 5 µl de GS3-AS (100 pmol/µl), 2 µl de tampón de hibridación 10X (Tris-Cl 100 mM [pH 8,0], NaCl 1 M, EDTA 10 mM) y 8 µl de agua) a 98 °C durante 10 min y enfriando a 25 °C durante 1 hora. El enlazador hibridado se digirió con *Age*I y el vector pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf preparado en el ejemplo 2 también se digirió con *Age*I. El vector digerido se trató con 1 µl de CIP (fosfatasa intestinal de ternero; NEB, n.º M0290S) a 37 °C durante 1 hora y se sometió a un procedimiento de extracción en gel (QIAGEN, n.º 28704), seguido de ligamiento a una relación molar de 1:3 (vector: inserto) usando ADN ligasa T4 (TAKARA, n.º 2011A).

3) Construcción de vectores de expresión FVII-enlazador GS-5-Tf a FVII-enlazador GS-15-Tf

Para construir un vector de expresión de proteínas de fusión que contuviera un enlazador GS-5, se implementó una nueva estrategia. Se construyeron vectores de fusión FVII-Tf que contenían enlazadores extendidos siguiendo dos etapas.

La primera etapa es la adición de un enlazador GS2 bicatenario (bc) al enlazador previamente obtenido. Después de asegurar la extensión del enlazador, el enlazador se cortó y se insertó entre los genes de FVII y Tf en el vector pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf. Por ejemplo, para extender el enlazador GS-3 al enlazador GS-5, la unidad de enlazador GS-2bc sintetizada de la SEQ ID NO: 35 se digirió con *Bgl*II y se ligó con el vector pcDNA3.1-hygro-FVII-GS3-Tf tratado con *BamH*I y *Stu*I. A continuación, después de confirmar la extensión del enlazador mediante digestión con *BamH*1 y *Age*I, el enlazador extendido se cortó con *Age*I y se subclonó en el vector pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf tratado con *Age*I y CIP. Se construyeron vectores de expresión de fusión de FVII-Tf que contenían enlazadores GS-7, GS-9, GS-11, GS-13 y GS-15 mediante la misma estrategia (véase Fig. 3).

Ejemplo 4: Construcción de vector de expresión de FVII-Tf (pcDNA3.1-hygro-FVII-GS1-T-Tf) que contiene un enlazador que comprende un sitio de escisión de trombina

Se preparó un enlazador que contenía un sitio de escisión de trombina uniendo una unidad de GS-1 a ambos extremos de la secuencia de reconocimiento de trombina (en lo sucesivo en el presente documento, denominada "enlazador GS1-T"). El enlazador GS1bc-T de SEQ ID NO: 36 (con sentido) se diseñó y se sintetizó para contener sitios *Age*I en ambos extremos. El enlazador GS1bc -T se digirió con *Age*I y se purificó usando un kit de purificación de PCR (Qiagen, cat n.º: 28104). El enlazador purificado se ligó en el vector pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf tratado con CIP/*Age*I.

Ejemplo 5: Construcción del vector de expresión de FVII-Tf (pcDNA3.1-hygro-FVII-Hélice-Tf) que contiene un enlazador helicoidal

Se preparó un ADN de enlazador helicoidal por el método desvelado en la publicación de los Estados Unidos abierta a inspección pública N.º 2009/0170163. Se añadió un sitio *Age*I a ambos extremos del ADN de enlazador de helicoidal preparado usando cebadores, enlazador helicoidal S y enlazador helicoidal AS (SEQ ID NO: 37 y 38). Los cebadores enlazador helicoidal S y enlazador helicoidal AS se hibridaron y digirieron con *Age*I, seguido de inserción en el vector pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf con *Age*I y CIP. El vector construido se confirmó mediante secuenciación de ADN.

Ejemplo comparativo 1: Construcción del vector de expresión de fusión de FVII-albúmina (FVII-Alb)

Se construyó la proteína de fusión de FVII-albúmina desvelada en la patente de EP N.º 1816201. Se obtuvo ADNc de albúmina humana mediante RT-PCR usando ARNm de hígado humano (Clontech) como un molde y cebadores específicos de genes de albúmina, Albúmina-S y Albúmina-AS (SEQ ID NO: 39 y 40). Se realizó RT-PCR usando el kit del sistema de RT-PCR de alta fidelidad AccuScript (Cat n.º 600180) según el manual del fabricante. En primer lugar, 10 µl de solución de reacción de transcripción inversa (1 µl de tampón de transcriptasa inversa10X, 0.6 µl de cebador de oligo-dT, 1 µl de dNTP, 0,4 µl de agua, 5 µl de ARNm de hígado humano (10 ng/µl)) se mantuvieron a 65 °C durante 5 min y a una temperatura ambiente durante 5 min, y se sometió a una reacción con 1 µl de DTT 100 mM y 1 µl de transcriptasa inversa a 42 °C durante 1 hora. Se obtuvo una secuencia de albúmina humana mediante PCR usando el ADNc sintetizado como un molde y los cebadores Albúmina-S y Albúmina-AS. La PCR se realizó tratando 50 µl de una solución de reacción (1 µl de ADNc, 10 µl de tampón Phusion HF 5x, 1 µl de cebadores Albúmina-S y Albúmina-AS, respectivamente, 1 µl de dNTP 10 mM, 0,5 µl de ADN polimerasa Phusion (FINNZYMES, n.º F-530S; 2 unidades/µl) y

35,5 µl de agua) en la siguiente condición: 1 ciclo de desnaturalización a 98 °C durante 1 min, 30 ciclos de amplificación a 98 °C durante 10 s, a 62°C durante 30 s, y a 72 °C durante 60 s, y 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min. Los oligonucleótidos sintetizados de SEQ ID NO: 41 y 42 se hibridaron con el enlazador GS [$SS(GGS)_9GS$] (SEQ ID NO: 45) divulgada en la Patente de EP n.º 1816201. Para conectar el ADNc de FVII en el ejemplo 1 con el enlazador anterior, el codón de terminación de FVII en el vector pcDNA3.1-hygro-FVII se reemplazó con el sitio de *Xho*I mediante mutagénesis basada en PCR usando los cebadores mut FVII(XhoI)-S y mut FVII(XhoI)-AS (SEQ ID NO: 43 y 44). Usando sitios *Xho*I/*Apa*I, el enlazador GS [$SS(GGS)_9GS$] se fusionó con el extremo 3' de ADNc de FVII en el vector pcDNA3.1-hygro-FVII. Finalmente, el ADNc de albúmina humana digerido con BamHI se insertó en el vector pcDNA3.1-hygro-FVII-enlazador GS. El vector de expresión pcDNA3.1-hygro-FVII-enlazador GS-albúmina se verificó por secuenciación de ADN.

Las características de vectores de expresión construidos en los ejemplos 2 a 5 y el ejemplo comparativo 1 se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

[Tabla 1]

Proteína de fusión de FVII	Extremo C de FVII	Secuencia de enlazador (SEQ ID NO)	Extremo N del compañero de fusión	Número de aminoácidos en el enlazador
FVII-Tf	APFP		VPDKTV	0
FVII-GS1-Tf	APFP	GGGGS (SEQ ID NO: 3)	VPDKTV	5
FVII-GS3-Tf	APFP	$(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 4)	VPDKTV	15
FVII-GS5-Tf	APFP	$(GGGGS)_5$ (SEQ ID NO: 5)	VPDKTV	25
FVII-GS7-Tf	APFP	$(GGGGS)_7$ (SEQ ID NO: 6)	VPDKTV	35
FVII-GS9-Tf	APFP	$(GGGGS)_9$ (SEQ ID NO: 7)	VPDKTV	45
FVII-GS11-Tf	APFP	$(GGGGS)_{11}$ (SEQ ID NO: 8)	VPDKTV	55
FVII-GS13-Tf	APFP	$(GGGGS)_{13}$ (SEQ ID NO: 9)	VPDKTV	65
FVII-GS15-Tf	APFP	$(GGGGS)_{15}$ (SEQ ID NO: 10)	VPDKTV	75
FVII-GS1-T-Tf	APFP	GGGGSLVPRGSGGGS (SEQ ID NO: 12)	VPDKTV	15
FVII-Hélice-Tf	APFP	$GA(EAAAK)_4A$ (SEQ ID NO: 11)	VPDKTV	23
FVII-Alb	APFP	$SS(GGS)_9GS$ (SEQ ID NO: 45)	DAHK	31

* Para FVII-Tf, está presente Thr-Gly obtenido de *Age*I.* Para los enlazadores de las SEQ ID NO: 4 a 12, está presente Thr obtenido de *Age*I en el extremo N y está presente Thr-Gly obtenido de *Age*I en el extremo C.

Ejemplo experimental 1: Medición de actividades específicas de proteínas de fusión de FVII

Las proteínas de fusión de FVII construidas en los ejemplos 2 a 5 y el ejemplo comparativo 1 se expresaron en una célula CHO (CHO(VK2)) que expresa de forma estable VKORC1 (subunidad 1 del complejo de vitamina K epóxido reductasa).

Los vectores de expresión construidos en los ejemplos 2 a 5 y el ejemplo comparativo 1 se purificaron usando el maxi kit de plásmidos Endo-free (Qiagen, n.º 27104). Se usó β-galactosidasa como un control interno para transfección. Se sembraron células CHO (VK2) a una densidad de $1{,}5x10^6$ células/pocillo en placas de 6 pocillos. Las células se incubaron en α-MEM (Lonza, n.º 12-169F) complementado con FBS 10 % (Lonza, n.º 14-501F), HT 1X (Invitrogen, n.º 11067-030), L-glutamina 4 mM (Lonza, n.º 17-605E) y 200 µg/ml de higromicina (Invitrogen, n.º 10687-010) durante 24

horas, y después se transfectaron usando lipofectamine 2000 (Invitrogen) según el manual del fabricante. Cuatro horas después de la transfección, el medio se reemplazó con medio sin suero (OptiMEM) y se complementó con 5 µg/ml de vitamina K. Después de 48 horas de incubación, se tomaron muestras del medio de cultivo y se almacenó a -70 °C.

Se analizaron las proteínas de fusión de FVII con respecto a sus actividades cromogénicas y cantidades de antígeno usando el kit de ensayo del factor VII COATEST (Chrmogenix, n.º 821900-63) y el kit de ELISA de FVII (Cedarlene Lab, n.º CL20030K), respectivamente. Los ensayos se realizaron según el manual del fabricante. Se usó plasma humano convencional normalizado frente al patrón de la OMS como un FVII de control en ambos ensayos. La proteína de expresión se evaluó mediante análisis de transferencia de Western. Se cargaron cantidades iguales de proteínas de fusión de FVII basándose en los resultados de ELISA. Se descubrió que las proteínas de fusión de FVII expresadas tenían los tamaños esperados sin fragmentación detectable (véase Fig. 4).

Al mismo tiempo, las actividades específicas de proteínas de fusión de FVII-transferrina fueron de 0,74 a 1, que eran mayores en comparación con la de la proteína de fusión de FVII-albúmina (0,52) (véase tabla 2). Las proteínas de fusión de FVII-transferrina que contenían enlazadores también conservaron no menos del 70 % de actividades de FVII. No hubo ninguna relación entre las longitudes de los enlazadores y las actividades específicas, pero las proteínas de fusión de FVII con enlazadores GS más cortos mostraron actividades específicas algo mayores que las proteínas de fusión con enlazadores GS más largos. En particular, las proteínas de fusión FVII-GS1-Tf y FVII-GS1-T-Tf mostraron actividades específicas (véase Fig. 5).

Tabla 2

[Tabla 2]

Proteína de fusión de FVII	Antígeno (%)	Actividad (%)	Actividad específica (actividad/antígeno)
FVII-Tf	53,2 ± 5,0	43,9 ± 0,3	0,82
FVII-GS1-Tf	53,4 ± 3,1	52,0 ± 0,5	0,97
FVII-GS3-Tf	61,9 ± 8,0	57,7 ± 0,2	0,93
FVII-GS5-Tf	69,3 ± 5,6	55,9 ± 1,4	0,81
FVII-GS7-Tf	70,9 ± 8,2	59,3 ± 1,1	0,84
FVII-GS9-Tf	64,2 ± 8,6	47,5 ± 0,7	0,74
FVII-GS11-Tf	59,1 ± 3,9	45,3 ± 0,9	0,77
FVII-GS13-Tf	59,7 ± 5,1	49,1 ± 0,8	0,82
FVII-GS15-Tf	59,2 ± 6,0	50,2 ± 0,5	0,85
FVII-GS1-T-Tf	70,8 ± 8,7	71,0 ± 2,6	1,00
FVII-Hélice-Tf	89,0 ± 5,7	78,9 ± 2,2	0,89
FVII-Alb	106,6 ± 5,4	54,9 ± 3,3	0,52

Ejemplo 6: Caracterización de proteínas de fusión de FVII según la dirección de fusión de Tf

En este ejemplo, se preparó una proteína de fusión en la que la transferrina humana (Tf) está unida al extremo N de FVII y se comparó con una proteína de fusión en la que la transferrina se une con el extremo C del FVII, para examinar el cambio de características según la dirección de fusión en proteínas de fusión. El procedimiento detallado es el siguiente.

<6-1> Construcción de vectores de expresión de Tf-FVII y Tf-GS1-T-FVII

Se diseñaron dos proteínas de fusión con Tf unida al extremo N de FVII de la siguiente manera: (1) (péptido líder de Tf)-(Tf madura)-(Thr-Gly)-(FVII maduro); y (2) (péptido líder de Tf)-(Tf madura)-(Thr)-(GS1-T; SEQ ID NO: 12)-(Thr-Gly)-(FVII maduro).

En primer lugar, para obtener una secuencia génica de Tf que contuviera un péptido líder, se diseñó un cebador directo (Nhe-Tf: SEQ ID NO: 46) para contener un sitio *Nhe*I con el fin de clonar y se diseñó un cebador inverso (Tf-Age: SEQ ID NO: 47) para contener un sitio *Age*I con el fin de retirar el codón de terminación de transferrina y clonar. Para clonar el FVII maduro con el péptido líder retirado, se diseñó un cebador directo (Age-FVII: SEQ ID NO: 48) para contener un sitio *Age*I y se diseñó un cebador inverso para contener un sitio *Xho*I.

Para el gen de Tf, se usó ADNc obtenido de Origene (Cat n.º SC322130) como en el ejemplo 2 como un molde de PCR. La PCR se realizó tratando 50 µl de una solución de reacción (1 µl de molde de vector, 2 µl de cebadores *Nhe*-Tf y Tf-*Age*I (10 µM), 10 µl de tampón Phusion HF 5x, 1 µl de dNTP 10 mM, 0,5 µl de ADN polimerasa Phusion (FINNZYMES, n.º F-530S, 2 unidades/µl) y 33,5 µl de agua) en la siguiente condición: 1 ciclo de desnaturalización a 98 °C durante 30 s, 25 ciclos de amplificación a 98 °C durante 10 s, a 70 °C durante 30 s, y a 72 °C durante 36 s, y 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 min. FVII se amplificó mediante PCR usando un vector pcDNA3.1-hygro-FVII-GS1-T-Tf como un molde como en el ejemplo 4. Las condiciones de PCR fueron iguales que las condiciones de PCR de Tf anteriores, excepto por el uso de cebadores Age-FVII (10 µM) y VH-Xho (10 µM).

El gen de Tf amplificado se insertó en el vector pcDNA3.1-hygro-FVII-GS1-T-Tf usando *Nhe*I/*Age*I para obtener el vector pcDNA3.1-hygro-Tf-Tf. El vector de pcDNA3.1-hygro-Tf-Tf y el producto de PCR de FVII se digirieron con *Age*I/*Xho*I y se ligaron para construir un vector de expresión que contenía la proteína de fusión pcDNA3.1-hygro-Tf-FVII. El vector de expresión pcDNA3.1-hygro-Tf-GS1-T-FVII se construyó insertando la secuencia de GS1bc-T sintetizada en el ejemplo 4 mediante *Age*I. Los vectores de expresión construidos se confirmaron por mapeo de restricción y secuenciación de ADN.

<6-2> Expresión de proteínas de fusión y caracterización

Para caracterizar las proteínas de fusión con Tf unida al extremo N de FVII, los vectores de expresión de las mismas, es decir, pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf, pcDNA3.1 -hygro-FVII-GS1-Tf-VII, pcDNA3.1-hygro-Tf-FVII y pcDNA3.1-hygro-Tf-GS1-T-FVII, se expresaron de forma transitoria en células CHO.

Los cuatro ADN plasmídicos construidos se aislaron usando el kit de maxipre Endo-free (Qiagen). Un día antes de la transfección, se aislaron células CHO (DG44) cultivadas en matraces T75 mediante tripsina y se sembraron a una densidad de $1{,}5x10^6$ células/pocillo en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas, las células se transfectaron según el manual del fabricante.

Cuatro horas después de la transfección, el medio en cada pocillo se retiró y se reemplazó con 2 ml de un medio de cultivo complementado con 5 µg/ml de vitamina K. Después de la transfección, la placa de 6 pocillos se incubó en un incubador de CO_2 5 %, a 37 °C, y, después de 48 horas, se recogió el medio. El sobrenadante recogido se transfirió a tubos de 1,5 ml y se almacenó a -70 °C para ensayo cromogénico y ELISA de FVII. La placa con el medio retirado se lavó con 2 ml de HBSS por cada pocillo y se lisó con 250 µl de una solución de lisis (Tropix, n.º ABX210LM, adición de DTT 1 mM), seguido de almacenamiento a -70 °C para ensayo de β-galactosidasa.

El ensayo cromogénico y ELISA de FVII se realizaron como en el ejemplo experimental 1. Se prepararon muestras para análisis descongelando el medio almacenado congelado después de la transfección justo antes del experimento y obteniendo el sobrenadante mediante centrifugación. Se usó plasma humano (Dade Behring, n.º ORKL13, Lote n.º 503216F) como un patrón en el ensayo.

Los resultados de la medición se muestran en la tabla 3. Para Tf-FVII y Tf-GS1-T-Tf con Tf unida al extremo N del FVII, no se midieron actividades a diferencia de FVII-Tf y FVII-GS1-T-Tf con Tf unido al extremo C del FVII. Además, se detectaron cantidades bajas de proteínas de fusión con Tf unida al extremo N en ELISA del FVII. Sin embargo, las proteínas de fusión mostraron sensibilidades de detección similares, independientemente de las direcciones de fusión, en resultados de transferencia de Western usando anticuerpos policlonales de Tf. Estos resultados indican que, cuando Tf está unida al extremo N del FVII, se generaron proteínas de fusión sin actividades de FVII, incluso aunque se realizaran normalmente traducciones de aminoácidos.

Tabla 3

[Tabla 3]

Proteína de fusión	Actividad de FVII (%)	Antígeno de FVII (%)	Actividad específica (actividad/antígeno)
FVII-Tf	33,8 ± 0,73	37,0 ± 2,17	0,92
Tf-FVII	no detectado	8,0 ± 1,51	-
FVII-GS-l-T-Tf	46,6 ± 0,29	43,0 ± 4,75	1,08

Proteína de fusión	Actividad de FVII (%)	Antígeno de FVII (%)	Actividad específica (actividad/antígeno)
Tf-GS-I-T-Tf	no detectado	13,5 ± 1,01	-

Ejemplo 7: Caracterización de proteínas de fusión según la supresión de secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción usadas en la fusión

En el ejemplo 2, se usaron secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción *(AgeI)* para facilitar la inserción de diversos enlazadores entre FVII y Tf. Como consecuencia, algunas proteínas de fusión llegaron a tener Thr y Gly que están codificadas por la enzima de restricción anterior, en ambos extremos de los enlazadores. En este ejemplo, se examinó si las propiedades de proteínas de fusión son alteradas o no por la presencia de la secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción *(AgeI)*.

Las secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción se suprimieron de la proteína de fusión FVII-GS1-T-Tf que contenía enlazador GS1-T, mediante mutagénesis dirigida basada en PCR usando cebadores mutagénicos. Como se muestra en la Fig. 6, este experimento se diseñó para suprimir "Thr" en el extremo N y "Thr-Gly" en el extremo C y se enumeran cebadores usados en el experimento en la tabla 4.

Tabla 4

[Tabla 4]

Cebador	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO
TG del-S	CAG CGG AGG CGG TTC AGT CCC TGA TAA AACTG	50
TG del-AS	CAG TTT TAT CAG GGA CTG AAC CGC CTC CGC TG	51
T del-S	CGA GCC CCA TTT CCC GGT GGA GGC GGA TC	52
T del-AS	GAT CCG CCT CCA CCG GGA AAT GGG GCT CG	53

<7-1> Supresión de Thr-Gly

Se realizó mutagénesis basada en PCR. La PCR se realizó tratando una solución de reacción (1 µl de vector pcDNA3.1-hygro-FVII-GS1-T-Tf, 0,2 µl de cebador con sentido (TG del-S 10 µM), 0,2 µl de cebador antisentido (TG del-AS 10 µM), 1 µl de dNTP 10 mM, 4 µl de tampón de PCR 5X, 14 µl de agua y 0,2 µl de ADN polimerasa Phusion (FINNZYMES,# F-530S)) en la siguiente condición: 1 ciclo de desnaturalización a 98 °C durante 30 s, 18 ciclos de amplificación a 98 °C durante 10 s, a 58 °C durante 30 s, y a 72 °C durante 3 min, y 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min. Para retirar el ADN molde original, el producto de PCR amplificado se trató con 1 µl de *Dpn*I (NEB, n.º R0176S) y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se transformaron 50 µl de célula HIT competente (DH5α, RH617) usando 10 µl del ADN tratado con *Dpn*I y se incubaron en un medio sólido de LB+amp (10 mg/ml) durante una noche. Se analizaron cuatro clones obtenidos de este modo mediante secuenciación de ADN y se verificaron dos clones como mutantes.

<7-2> Supresión de Thr

Para suprimir Thr, se realizó un método similar al del ejemplo <7-1> usando diferentes cebadores. Brevemente, se realizó mutagénesis basada en PCR usando, como molde, 1 µl de ADN plasmídico de los clones en los que la mutación se confirmó en el ejemplo <7-1> y 1 µl de cebador con sentido (T del-S; 10 pmol) y 1 µl de cebador antisentido (T del-AS; 10 pmol), en la misma condición. Por secuenciación de ADN de cuatro clones que se seleccionaron, se confirmó que tres clones tenían mutaciones. El vector de expresión obtenido se denominó "pcDNA3.1-hygro-FVII-GS1-T-Tf(M3)".

<7-3> Caracterización de proteínas de fusión con secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción suprimidas

Se transfectaron células CHO con vectores de expresión FVII-GS1-T-Tf y FVII-GS1-T-Tf(M3) y vector de expresión FVII-Alb como un control, y se obtuvieron los sobrenadantes del medio. Los sobrenadantes obtenidos se sometieron a un ensayo cromogénico de FVII (Chromogenix) y ELISA de FVII (cedarlane) para verificar el cambio en la relación de actividad/antígeno. Como se muestra en la tabla 5, las cantidades de antígenos y actividades de proteínas de fusión FVII-GS1-T-Tf y FVII-GS1-T-Tf(M3) fueron casi iguales entre sí y las relaciones (actividades específicas) tampoco variaron. Además, se confirmó que las actividades específicas eran significativamente mayores que la de la proteína de fusión FVII-Alb.

Tabla 5

[Tabla 5]

	Antígeno de FVII (%)	Actividad de FVII (%)	Actividad específica (actividad/antígeno)
FVII-GS1-T-Tf	34,1 ± 2,1	39,6 ± 2,2	1,16
FVII-GS1-T-Tf(M3)	33,5 ± 4,7	38,0 ± 0,7	1,14
FVII-Alb	50,1 ± 1,2	26,3 ± 0,8	0,53

Ejemplo 8: Medición de la semivida de proteínas de fusión

Para examinar el aumento de la semivida en las proteínas de fusión según la presente invención, FVII-Tf, FVII-GS1-Tf, FVII-GS3-Tf, FVII-GS15-Tf y FVII- GS1-T-Tf se usaron como grupos experimentales y FVII de tipo silvestre y FVIIa disponible en el mercado (NovoSeven®; Novo Nordisk) se usaron como grupos de control.

<8-1> Preparación de muestras

1) Obtener medio de expresión

La proteína de FVII de tipo silvestre y cinco proteínas de fusión de FVII fusionadas con Tf se expresaron en la línea celular CHO-S FreeStyle™ (Invitrogen, Cat. n.º R800-07). Las células CHO-S se cultivaron en suspensión en un matraz de agitación con medio de expresión de CHO freestyle complementado con L-glu 8 mM (GIBCO, L-glutamina 200 mM (100X), Cat. N.º 25030-081). Las células cultivadas se sembraron a una densidad de $4x10^5$ células/ml 24 horas antes de la transfección y se transfectaron cuando la densidad llegó a 1 x 10^6 células/ml.
Los ADN usados en la transfección se prepararon usando el kit de maxi prep Endo-free (QIAGEN, Cat. N.º 12362) o kit de mega prep plasmídico Endo-free (QIAGEN, 12381), y la transfección se realizó en referencia al protocolo de transfección de reactivo FreeStyle MAX (Invitrogen, Cat. N.º 16447-100). Se añadieron 500 µg de ADN a 8 ml de OptiPRO SFM (Invitrogen, Cat. N.º 12309-019) y se mezclaron. A otro tubo, se añadieron 8 ml de OptiPRO SFM (Invitrogen, Cat. N.º 12309-019) y 500 µl de reactivo FreeStyle Max, y después los dos anteriores se mezclaron lentamente y se almacenaron a temperatura ambiente durante 10 min. Después de 10 min, se transfectaron células CHO-S FreeStyle™ con la mezcla. Las células transfectadas se cultivaron en un incubador de CO_2 5 %, a 37 °C, durante 3~5 días y después se obtuvo el sobrenadante.

2) Purificación del medio de expresión

El medio obtenido por un cultivo de matraz de agitación se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Corning) para retirar las células y los residuos restantes. El medio filtrado se concentró 10 veces por ultrafiltración usando membrana de flujo tangencial (satorius, 30 KDa). El medio concentrado se aplicó a una columna XK16/20 (GE healthcare) cargada con resina de hidroxiapatita cerámica (BIO-RAD, 157-0040). La columna de hidroxiapatita cerámica se equilibró con más de 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrado (imidazol 25 mM, Tween 80 0,02 % y NaCl 150 mM, pH 6,5). Después de cargar el medio concentrado, la columna se lavó con el tampón de equilibrado y tampón de lavado-1 (imidazol 25 mM, Tween 80 0,02 %, fosfato de sodio 100 mM, pH 6,3) y tampón de lavado-2 (imidazol 25 mM, Tween 80 0,02 %, fosfato de sodio 100 mM, NaCl 1 M, pH 6,3). Tras el lavado, la proteína de fusión capturada en la columna se eluyó con un tampón de elución (imidazol 25 mM, Tween 80 0,02 %, fosfato de sodio 500 mM, pH 6,3). La proteína eluida se analizó mediante ensayo cromogénico de FVII, ensayo de ELISA de FVII y SDS-PAGE/transferencia de Western.

<8-2> Ensayo de transferencia de Western

Se confirmó que las proteínas de fusión de FVII y FVII/Tf purificadas parcialmente mediante columnas de dos etapas tenían 45 % o más de purezas por SDS-PAGE/tinción con azul de Coomassie. La presencia de fragmentos obtenidos de FVII en las proteínas purificadas se evaluó por transferencia de Western, ya que los FVII fragmentados en proteínas de fusión purificadas podrían tener semivida más corta que la proteína de fusión de FVII intacta y producir un error en la determinación de la semivida de cada proteína de fusión de FVII. NovoSeven® (Novo Nordisk, 1,2 mg/vial, 60 KUI) y las muestras purificadas se prepararon a 0,1 UI (actividad de FVII)/10 µl, y después se realizó SDS-PAGE usando gel bis-Tri 4-12 % NuPage (Invitrogen). Después de finalizar la electroforesis, el gel se transfirió a una membrana de PVDF y la membrana se bloqueó a temperatura ambiente durante 1 hora añadiendo 10 ml de tampón de bloqueo (Tris 25 mM, NaCl 150 mM (pH 7,2), leche desnatada al 5 % y Tween 80 0,1 %). La solución de bloqueo se decantó y se añadieron 10 ml (leche desnatada al 5 % en PBS-T) de anticuerpo anti FVII (Cat. N.º F8146, Sigma) o anticuerpo antitransferrina (sc52256, santa cruz) a una relación de 1:5000 y 1:500, y se incubó durante 1 hora en un agitador oscilante. La membrana se lavó cuatro veces con una solución de lavado (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2) y se incubó durante 1 hora en 10 ml (leche desnatada al 5 % en PBS-T) de solución en la que se había añadido anticuerpo

de cabra anti IgG de ratón-HRP (Cat. No. G21040, Invitrogen) como un anticuerpo secundario a una relación de 1:50.000. Después de lavarse la membrana cuatro veces con una solución de lavado (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.2), se añadieron 2 ml de mezcla Femto de west Super-signal (Thermo) a ella durante 5 min. Tras finalizar la reacción, se reveló la película.

Los resultados de transferencia de Western se muestran en la Fig. 7. Como se muestra en la Fig. 7, no se detectaron fragmentos obtenidos de FVII en las proteínas purificadas. No se detectaron transferrinas fragmentadas en la mancha de transferencia explorada mediante anticuerpo antitransferrina.

<8-3> Medición de la semivida

Las semividas de la proteína de fusión que no tienen ningún enlazador, las proteínas de fusión que tienen cuatro enlazadores (GS1, GS1-T, GS3 y GS15), y un FVII de tipo silvestre expresado y purificado en la misma condición y un NovoSeven disponible en el mercado como controles se midieron y se compararon entre sí en ratas. El análisis cuantitativo de la cantidad de FVII en muestras para administrar y muestras recogidas de un experimento animal se realizó mediante ELISA de FVII humano (Cedarlane, anticuerpos emparejados para ELISA de factor VII, n.º CL20030K), según las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de muestras para administrar se determinaron promediando los valores de tres diluciones diferentes de una muestra. La solución de dilución de administración (NaCl 3 mg/ml, $CaCl_2$ dihidrato 1,5 mg/ml, glicilglicina 1,3 mg/ml, polisorbato 80 0,1 mg/ml y manitol 30 mg/ml, pH 5,5) se usó como un diluyente. Después de la cuantificación de ELISA de FVII, cada proteína se diluyó con la solución de dilución de administración y la muestra diluida se administró por vía intravenosa a ratas (250~300 g de Sprague Dawley, tres ratas por grupo) a través de la vena de la cola a 150 UI/kg basándose en los pesos de las ratas medidos el día del experimento. Las sangres se tomaron en un total de once puntos temporales, es decir, 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 1,5 horas, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas y 24 horas después de la administración del fármaco. Se mezclaron 225 µl de la sangre y 25 µl de citrato de sodio 3,2 % y se centrifugaron a 4 °C y 13.000 rpm durante 1 min, seguido de almacenamiento del sobrenadante a -70 ºC. Se analizó plasma de rata mediante dilución de 1/50 o 1/100 con un tampón de lavado usado en un kit de ELISA de FVII (cedarlane). Se obtuvo una curva de regresión representando el logaritmo de la concentración de antígeno de FVII humano frente a los puntos temporales de toma de muestras. La semivida de cada FVII se determinó calculando a partir de la fórmula 'semivida = ln2 / pendiente de curva de regresión'. Como se muestra en la tabla 6, las proteínas de fusión de la presente invención mostraron una semivida mejorada 3~4 veces en comparación con el FVII de tipo silvestre.

Tabla 6

[Tabla 6]

Tipo	Semivida (min)
FVII-GS1-Tf	254,2 ± 19,1
FVII-GS3-Tf	227,4 ± 23,5
FVII-GS1-T-Tf	235,4 ± 27,4
FVII-GS15-Tf	257,0 ± 23,9
FVII-Tf	277,0 ± 24,5
NovoSeven	80,3 ± 27,4
FVII de tipo natural	59,6 ± 2,9

<110> SK CHEMICALS CO., LTD.

<120> Proteína de fusión que tiene actividad del factor VII

<130> PCB105030

<150> KR 10-2010-0052719
<151> 04-06-2010

<160> 53
<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 444
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(444)
<223> Proteína del factor VII

<400> 1

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
            20                  25                  30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
        35                  40                  45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
    50                  55                  60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65                  70                  75                  80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
                85                  90                  95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
            100                 105                 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
        115                 120                 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
    130                 135                 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
145                 150                 155                 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
                165                 170                 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
            180                 185                 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
        195                 200                 205
```

```
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
    210                 215                 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
225                 230                 235                 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
                245                 250                 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
            260                 265                 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
        275                 280                 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
    290                 295                 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305                 310                 315                 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
                325                 330                 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
            340                 345                 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
        355                 360                 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
    370                 375                 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385                 390                 395                 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
                405                 410                 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
            420                 425                 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
        435                 440
```

<210> 2
<211> 679
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(679)
<223> Proteína de transferrina

<400> 2

```
Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu His Glu Ala
  1               5                  10                  15

Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val Ile Pro Ser
             20                  25                  30

Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr Leu Asp Cys
         35                  40                  45
```

```
Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Ala
     50                  55                  60

Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu Lys Pro Val
 65                  70                  75                  80

Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr
                 85                  90                  95

Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met Asn Gln Leu
            100                 105                 110

Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp
        115                 120                 125

Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu Pro Arg Lys
    130                 135                 140

Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser Cys Ala Pro
145                 150                 155                 160

Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu Cys Pro Gly
                165                 170                 175

Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe
            180                 185                 190

Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Ser
        195                 200                 205

Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu
    210                 215                 220

Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu Tyr Lys Asp
225                 230                 235                 240

Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala Arg Ser Met
                245                 250                 255

Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln Ala Gln Glu
            260                 265                 270

His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe Ser Ser Pro
        275                 280                 285

His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly Phe Leu Lys
    290                 295                 300

Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr Glu Tyr Val
305                 310                 315                 320

Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu Ala Pro Thr
                325                 330                 335

Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His His Glu Arg
            340                 345                 350

Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys Ile Glu Cys
        355                 360                 365

Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile Met Asn Gly
    370                 375                 380
```

```
Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr Ile Ala Gly
385                 390                 395                 400

Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn Lys Ser Asp
                405                 410                 415

Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val Ala Val Val
            420                 425                 430

Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys Gly Lys Lys
        435                 440                 445

Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met
    450                 455                 460

Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp Glu Phe Phe
465                 470                 475                 480

Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser Leu Cys Lys
                485                 490                 495

Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn Asn Lys Glu
            500                 505                 510

Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Lys Gly
        515                 520                 525

Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn Thr Gly Gly
    530                 535                 540

Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys Asp Tyr Glu
545                 550                 555                 560

Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu Tyr Ala Asn
                565                 570                 575

Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr Arg Lys Asp
            580                 585                 590

Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln His Leu Phe
        595                 600                 605

Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu Phe Arg Ser
    610                 615                 620

Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys Leu Ala Lys
625                 630                 635                 640

Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val
                645                 650                 655

Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser Leu Leu Glu
            660                 665                 670

Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro
        675
```

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador GS-1

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador GS-3

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 5
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador GS-5

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 6
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador GS-7

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 7
<211> 45
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador GS-9

<400> 7

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
  1               5                  10                  15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
              20                  25                  30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
          35                  40                  45
```

<210> 8
<211> 55
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador GS-11

<400> 8

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
  1               5                  10                  15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
              20                  25                  30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
          35                  40                  45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
      50                  55
```

<210> 9
<211> 65
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador GS-13

<400> 9

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
  1               5                  10                  15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
              20                  25                  30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
          35                  40                  45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
      50                  55                  60

Ser
 65
```

<210> 10
<211> 75
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador GS-15

<400> 10

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1               5                  10                  15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
            20                  25                  30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
        35                  40                  45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65                  70                  75
```

<210> 11
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador helicoidal

<400> 11

```
Gly Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala
 1               5                  10                  15

Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala
            20
```

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador GS1-T

<400> 12

```
Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1               5                  10                  15
```

<210> 13
<211> 3378
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia génica que codifica la proteína FVII-Tf

<400> 13

atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgt ccctgataaa actgtgagat ggtgtgcagt gtcggagcat 1380

gaggccacta agtgccagag tttccgcgac catatgaaaa gcgtcattcc atccgatggt 1440

cccagtgttg cttgtgtgaa gaaagcctcc taccttgatt gcatcagggc cattgcggca 1500

aacgaagcgg atgctgtgac actggatgca ggtttggtgt atgatgctta cctggctccc 1560

aataacctga agcctgtggt ggcagagttc tatgggtcaa aagaggatcc acagactttc 1620

tattatgctg ttgctgtggt gaagaaggat agtggcttcc agatgaacca gcttcgaggc 1680

aagaagtcct gccacacggg tctaggcagg tccgctgggt ggaacatccc cataggctta 1740

ctttactgtg acttacctga gccacgtaaa cctcttgaga aagcagtggc caatttcttc 1800

tcgggcagct gtgccccttg tgcggatggg acggacttcc cccagctgtg tcaactgtgt 1860

ccagggtgtg gctgctccac ccttaaccaa tacttcggct actcaggagc cttcaagtgt 1920

ctgaaggatg gtgctgggga tgtggccttt gtcaagcact cgactatatt tgagaacttg 1980

gcaaacaagg ctgacaggga ccagtatgag ctgctttgcc tggacaacac ccggaagccg 2040

gtagatgaat acaaggactg ccacttggcc caggtccctt ctcataccgt cgtggcccga 2100

agtatgggcg gcaaggagga cttgatctgg gagcttctca accaggccca ggaacatttt 2160

ggcaaagaca aatcaaaaga attccaacta ttcagctctc ctcatgggaa ggacctgctg 2220

tttaaggact ctgcccacgg gtttttaaaa gtccccccca ggatggatgc caagatgtac 2280

ctgggctatg agtatgtcac tgccatccgg aatctacggg aaggcacatg cccagaagcc 2340

ccaacagatg aatgcaagcc tgtgaagtgg tgtgcgctga gccaccacga gaggctcaag 2400

tgtgatgagt ggagtgttaa cagtgtaggg aaaatagagt gtgtatcagc agagaccacc 2460

gaagactgca tcgccaagat catgaatgga gaagctgatg ccatgagctt ggatggaggg 2520

tttgtctaca tagcgggcaa gtgtggtctg gtgcctgtct tggcagaaaa ctacaataag 2580

agcgataatt gtgaggatac accagaggca gggtattttg ctgtagcagt ggtgaagaaa 2640

tcagcttctg acctcacctg ggacaatctg aaaggcaaga agtcctgcca tacggcagtt 2700

ggcagaaccg ctggctggaa catccccatg ggcctgctct acaataagat caaccactgc 2760

agatttgatg aatttttcag tgaaggttgt gcccctgggt ctaagaaaga ctccagtctc 2820

tgtaagctgt gtatgggctc aggcctaaac ctgtgtgaac ccaacaacaa agagggatac 2880

tacggctaca caggcgcttt caggtgtctg gttgagaagg gagatgtggc ctttgtgaaa 2940

caccagactg tcccacagaa cactgggggа aaaaaccctg atccatgggc taagaatctg 3000

aatgaaaaag actatgagtt gctgtgcctt gatggtacca ggaaacctgt ggaggagtat 3060

gcgaactgcc acctggccag agccccgaat cacgctgtgg tcacacggaa agataaggaa 3120

gcttgcgtcc acaagatatt acgtcaacag cagcacctat ttggaagcaa cgtaactgac 3180

tgctcgggca acttttgttt gttccggtcg gaaaccaagg accttctgtt cagagatgac 3240

acagtatgtt tggccaaact tcatgacaga aacacatatg aaaaatactt aggagaagaa 3300

tatgtcaagg ctgttggtaa cctgagaaaa tgctccacct catcactcct ggaagcctgc 3360

actttccgta gaccttaa 3378

<210> 14
<211> 3387
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia génica que codifica la proteína FVII-GS1-Tf

<400> 14
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccggtggagg cggatccgtc cctgataaaa ctgtgagatg gtgtgcagtg 1380

tcggagcatg aggccactaa gtgccagagt ttccgcgacc atatgaaaag cgtcattcca 1440

tccgatggtc ccagtgttgc ttgtgtgaag aaagcctcct accttgattg catcagggcc 1500

attgcggcaa acgaagcgga tgctgtgaca ctggatgcag gtttggtgta tgatgcttac 1560

ctggctccca ataacctgaa gcctgtggtg gcagagttct atgggtcaaa agaggatcca 1620

cagactttct attatgctgt tgctgtggtg aagaaggata gtggcttcca gatgaaccag 1680

cttcgaggca agaagtcctg ccacacgggt ctaggcaggt ccgctgggtg gaacatcccc 1740

ataggcttac tttactgtga cttacctgag ccacgtaaac ctcttgagaa agcagtggcc 1800

aatttcttct cgggcagctg tgcccttgt gcggatggga cggacttccc ccagctgtgt 1860

caactgtgtc cagggtgtgg ctgctccacc cttaaccaat acttcggcta ctcaggagcc 1920

ttcaagtgtc tgaaggatgg tgctggggat gtggcctttg tcaagcactc gactatattt 1980

gagaacttgg caaacaaggc tgacagggac cagtatgagc tgctttgcct ggacaacacc 2040

cggaagccgg tagatgaata caaggactgc cacttggccc aggtcccttc tcataccgtc 2100

```
gtggcccgaa gtatgggcgg caaggaggac ttgatctggg agcttctcaa ccaggcccag      2160

gaacattttg gcaaagacaa atcaaaagaa ttccaactat tcagctctcc tcatgggaag      2220

gacctgctgt ttaaggactc tgcccacggg tttttaaaag tccccccccag gatggatgcc      2280

aagatgtacc tgggctatga gtatgtcact gccatccgga atctacggga aggcacatgc      2340

ccagaagccc caacagatga atgcaagcct gtgaagtggt gtgcgctgag ccaccacgag      2400

aggctcaagt gtgatgagtg gagtgttaac agtgtaggga aaatagagtg tgtatcagca      2460

gagaccaccg aagactgcat cgccaagatc atgaatggag aagctgatgc catgagcttg      2520

gatggagggt ttgtctacat agcgggcaag tgtggtctgg tgcctgtctt ggcagaaaac      2580

tacaataaga gcgataattg tgaggataca ccagaggcag ggtattttgc tgtagcagtg      2640

gtgaagaaat cagcttctga cctcacctgg gacaatctga aaggcaagaa gtcctgccat      2700

acggcagttg gcagaaccgc tggctggaac atccccatgg gcctgctcta caataagatc      2760

aaccactgca gatttgatga atttttcagt gaaggttgtg cccctgggtc taagaaagac      2820

tccagtctct gtaagctgtg tatgggctca ggcctaaacc tgtgtgaacc caacaacaaa      2880

gagggatact acggctacac aggcgctttc aggtgtctgg ttgagaaggg agatgtggcc      2940

tttgtgaaac accagactgt cccacagaac actgggggaa aaaaccctga tccatgggct      3000

aagaatctga atgaaaaaga ctatgagttg ctgtgccttg atggtaccag gaaacctgtg      3060

gaggagtatg cgaactgcca cctggccaga gccccgaatc acgctgtggt cacacggaaa      3120

gataaggaag cttgcgtcca caagatatta cgtcaacagc agcacctatt tggaagcaac      3180

gtaactgact gctcgggcaa cttttgtttg ttccggtcgg aaaccaagga ccttctgttc      3240

agagatgaca cagtatgttt ggccaaactt catgacagaa acacatatga aaaatactta      3300

ggagaagaat atgtcaaggc tgttggtaac ctgagaaaat gctccacctc atcactcctg      3360

gaagcctgca ctttccgtag accttaa                                          3387
```

<210> 15
<211> 3426
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia génica que codifica la proteína FVII-GS3-Tf

<400> 15

```
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct        60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac       120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc       180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt       240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag       300
```

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc 1380

accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag 1440

tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct 1500

tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat 1560

gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag 1620

cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa gaggatccac agactttcta ttatgctgtt 1680

gctgtggtga agaaggatag tggcttccag atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc 1740

cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg aacatcccca taggcttact ttactgtgac 1800

ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt 1860

gcccccttgtg cggatgggac ggacttcccc cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc 1920

tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt 1980

gctggggatg tggcctttgt caagcactcg actatatttg agaacttggc aaacaaggct 2040

gacagggacc agtatgagct gctttgcctg gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac 2100

aaggactgcc acttggccca ggtcccttct cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc 2160

aaggaggact tgatctggga gcttctcaac caggcccagg aacattttgg caaagacaaa 2220

tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct catgggaagg acctgctgtt taaggactct 2280

gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg atggatgcca agatgtacct gggctatgag 2340

tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa 2400

tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg 2460

agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt gtatcagcag agaccaccga agactgcatc 2520

gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc atgagcttgg atggagggtt tgtctacata 2580

gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg gcagaaaact acaataagag cgataattgt 2640

gaggatacac cagaggcagg gtattttgct gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac 2700

ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct 2760

ggctggaaca tccccatggg cctgctctac aataagatca accactgcag atttgatgaa 2820

tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt 2880

atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc aacaacaaag agggatacta cggctacaca 2940

ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc 3000

ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac 3060

tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac 3120

ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac 3180

aagatattac gtcaacagca gcacctattt ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac 3240

ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac cttctgttca gagatgacac agtatgtttg 3300

gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct 3360

gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga 3420

ccttaa 3426

<210> 16
<211> 3456
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia génica que codifica la proteína FVII-GS5-Tf

<400> 16
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1380

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg 1440

tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc 1500

gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc 1560

atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat 1620

gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa 1680

gaggatccac agactttcta ttatgctgtt gctgtggtga agaaggatag tggcttccag 1740

atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg 1800

aacatcccca taggcttact ttactgtgac ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa 1860

gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt gcccccttgtg cggatgggac ggacttcccc 1920

cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac 1980

tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt gctggggatg tggcctttgt caagcactcg 2040

actatatttg agaacttggc aaacaaggct gacagggacc agtatgagct gctttgcctg 2100

gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac aaggactgcc acttggccca ggtcccttct 2160

cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc aaggaggact tgatctggga gcttctcaac 2220

caggcccagg aacattttgg caaagacaaa tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct 2280

catgggaagg acctgctgtt taaggactct gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg 2340

atggatgcca agatgtacct gggctatgag tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa 2400

ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc 2460

caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt 2520

gtatcagcag agaccaccga agactgcatc gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc 2580

atgagcttgg atggagggtt tgtctacata gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg 2640

gcagaaaact acaataagag cgataattgt gaggatacac cagaggcagg gtattttgct 2700

gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag 2760

tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct ggctggaaca tccccatggg cctgctctac 2820

aataagatca accactgcag atttgatgaa tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct 2880

aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc 2940

aacaacaaag agggatacta cggctacaca ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga 3000

gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat 3060

ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg 3120

aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc 3180

acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac aagatattac gtcaacagca gcacctattt 3240

ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac 3300

cttctgttca gagatgacac agtatgtttg gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa 3360

aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca 3420

tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga ccttaa 3456

<210> 17
<211> 3486
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia génica que codifica la proteína FVII-GS7-Tf

<400> 17
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1380

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc 1440

accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag 1500

tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct 1560

tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat 1620

gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag 1680

cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa gaggatccac agactttcta ttatgctgtt 1740

gctgtggtga agaaggatag tggcttccag atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc 1800

cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg aacatcccca taggcttact ttactgtgac 1860

ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt 1920

gccccttgtg cggatgggac ggacttcccc cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc 1980

tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt 2040

gctggggatg tggcctttgt caagcactcg actatatttg agaacttggc aaacaaggct 2100

gacagggacc agtatgagct gctttgcctg gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac 2160

aaggactgcc acttggccca ggtcccttct cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc 2220

aaggaggact tgatctggga gcttctcaac caggcccagg aacattttgg caaagacaaa 2280

tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct catgggaagg acctgctgtt taaggactct 2340

gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg atggatgcca agatgtacct gggctatgag 2400

tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa 2460

tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg 2520

agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt gtatcagcag agaccaccga agactgcatc 2580

gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc atgagcttgg atggagggtt tgtctacata 2640

gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg gcagaaaact acaataagag cgataattgt 2700

gaggatacac cagaggcagg gtattttgct gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac 2760

ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct 2820

ggctggaaca tccccatggg cctgctctac aataagatca accactgcag atttgatgaa 2880

tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt 2940

atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc aacaacaaag agggatacta cggctacaca 3000

ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc 3060

ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac 3120

tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac 3180

ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac 3240

aagatattac gtcaacagca gcacctattt ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac 3300

ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac cttctgttca gagatgacac agtatgtttg 3360

gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct 3420

gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga 3480

ccttaa 3486

<210> 18
<211> 3516
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia génica que codifica la proteína FVII-GS9-Tf

<400> 18

atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1380

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1440

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg 1500

tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc 1560

gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc 1620

atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat 1680

gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa 1740

gaggatccac agactttcta ttatgctgtt gctgtggtga agaaggatag tggcttccag 1800

atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg 1860

aacatcccca taggcttact ttactgtgac ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa 1920

gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt gccccttgtg cggatgggac ggacttcccc 1980

cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac 2040

tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt gctggggatg tggcctttgt caagcactcg 2100

actatatttg agaacttggc aaacaaggct gacagggacc agtatgagct gctttgcctg 2160

gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac aaggactgcc acttggccca ggtcccttct 2220

cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc aaggaggact tgatctggga gcttctcaac 2280

caggcccagg aacattttgg caaagacaaa tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct 2340

catgggaagg acctgctgtt taaggactct gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg 2400

atggatgcca agatgtacct gggctatgag tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa 2460

ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc 2520

caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt 2580

gtatcagcag agaccaccga agactgcatc gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc 2640

atgagcttgg atggagggtt tgtctacata gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg 2700

gcagaaaact acaataagag cgataattgt gaggatacac cagaggcagg gtattttgct 2760

gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag 2820

tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct ggctggaaca tccccatggg cctgctctac 2880

aataagatca accactgcag atttgatgaa tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct 2940

aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc 3000

aacaacaaag agggatacta cggctacaca ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga 3060

gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat 3120

ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg 3180

aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc 3240

acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac aagatattac gtcaacagca gcacctattt 3300

ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac 3360

cttctgttca gagatgacac agtatgtttg gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa 3420

aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca 3480

tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga ccttaa 3516

<210> 19
<211> 3546
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia génica que codifica la proteína FVII-GS11-Tf

<400> 19
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

```
aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg   600
gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg   660
atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg   720
aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc   780
cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac   840
atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc   900
ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc   960
ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg  1020
ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat  1080
atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg  1140
gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc  1200
agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag  1260
tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga  1320
gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct  1380
ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct  1440
ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc  1500
accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag  1560
tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct  1620
tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat  1680
gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag  1740
cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa gaggatccac agactttcta ttatgctgtt  1800
gctgtggtga agaaggatag tggcttccag atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc  1860
cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg aacatcccca taggcttact ttactgtgac  1920
ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt  1980
gccccttgtg cggatgggac ggacttcccc cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc  2040
tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt  2100
gctggggatg tggcctttgt caagcactcg actatatttg agaacttggc aaacaaggct  2160
gacagggacc agtatgagct gctttgcctg gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac  2220
aaggactgcc acttggccca ggtcccttct cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc  2280
aaggaggact tgatctggga gcttctcaac caggcccagg aacattttgg caaagacaaa  2340
tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct catgggaagg acctgctgtt taaggactct  2400
gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg atggatgcca agatgtacct gggctatgag  2460
tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa  2520
```

tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg 2580

agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt gtatcagcag agaccaccga agactgcatc 2640

gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc atgagcttgg atggagggtt tgtctacata 2700

gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg gcagaaaact acaataagag cgataattgt 2760

gaggatacac cagaggcagg gtattttgct gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac 2820

ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct 2880

ggctggaaca tccccatggg cctgctctac aataagatca accactgcag atttgatgaa 2940

tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt 3000

atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc aacaacaaag agggatacta cggctacaca 3060

ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc 3120

ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac 3180

tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac 3240

ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac 3300

aagatattac gtcaacagca gcacctattt ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac 3360

ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac cttctgttca gagatgacac agtatgtttg 3420

gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct 3480

gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga 3540

ccttaa 3546

<210> 20
<211> 3576
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia génica que codifica la proteína FVII-GS13-Tf

<400> 20

```
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct      60
gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac     120
gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc     180
tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt     240
tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag     300
gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag     360
acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc     420
agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca     480
gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa     540
```

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1380

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1440

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1500

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg 1560

tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc 1620

gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc 1680

atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat 1740

gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa 1800

gaggatccac agactttcta ttatgctgtt gctgtggtga agaaggatag tggcttccag 1860

atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg 1920

aacatcccca taggcttact ttactgtgac ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa 1980

gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt gccccttgtg cggatgggac ggacttcccc 2040

cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac 2100

tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt gctggggatg tggcctttgt caagcactcg 2160

actatatttg agaacttggc aaacaaggct gacagggacc agtatgagct gctttgcctg 2220

gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac aaggactgcc acttggccca ggtcccttct 2280

cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc aaggaggact tgatctggga gcttctcaac 2340

caggcccagg aacattttgg caaagacaaa tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct 2400

catgggaagg acctgctgtt taaggactct gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg 2460

atggatgcca agatgtacct gggctatgag tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa 2520

ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc 2580

caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt 2640

gtatcagcag agaccaccga agactgcatc gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc 2700

atgagcttgg atggagggtt tgtctacata gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg 2760

gcagaaaact acaataagag cgataattgt gaggatacac cagaggcagg gtattttgct 2820

gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag 2880

tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct ggctggaaca tccccatggg cctgctctac 2940

aataagatca accactgcag atttgatgaa tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct 3000

aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc 3060

aacaacaaag agggatacta cggctacaca ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga 3120

gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat 3180

ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg 3240

aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc 3300

acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac aagatattac gtcaacagca gcacctattt 3360

ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac 3420

cttctgttca gagatgacac agtatgtttg gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa 3480

aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca 3540

tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga ccttaa 3576

<210> 21
<211> 3606
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia génica que codifica la proteína FVII-GS15-Tf

<400> 21
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1380

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1440

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1500

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc 1560

accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag 1620

tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct 1680

tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat 1740

gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag 1800

cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa gaggatccac agactttcta ttatgctgtt 1860

gctgtggtga agaaggatag tggcttccag atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc 1920

cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg aacatcccca taggcttact ttactgtgac 1980

ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt 2040

gcccccttgtg cggatgggac ggacttcccc cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc 2100

tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt 2160

gctggggatg tggcctttgt caagcactcg actatatttg agaacttggc aaacaaggct 2220

gacagggacc agtatgagct gctttgcctg gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac 2280

aaggactgcc acttggccca ggtcccttct cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc 2340

aaggaggact tgatctggga gcttctcaac caggcccagg aacattttgg caaagacaaa 2400

tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct catgggaagg acctgctgtt taaggactct 2460

gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg atggatgcca agatgtacct gggctatgag 2520

tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa 2580

tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg 2640

agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt gtatcagcag agaccaccga agactgcatc 2700

gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc atgagcttgg atggagggtt tgtctacata 2760

gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg gcagaaaact acaataagag cgataattgt 2820

gaggatacac cagaggcagg gtattttgct gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac 2880

ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct 2940

ggctggaaca tccccatggg cctgctctac aataagatca accactgcag atttgatgaa 3000

tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt 3060

atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc aacaacaaag agggatacta cggctacaca 3120

ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc 3180

ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac 3240

tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac 3300

ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac 3360

aagatattac gtcaacagca gcacctattt ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac 3420

ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac cttctgttca gagatgacac agtatgtttg 3480

gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct 3540

gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga 3600

ccttaa 3606

<210> 22
<211> 3450
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia génica que codifica la proteína FVII-Hélice-Tf

<400> 22

```
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct      60
gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac     120
gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc     180
tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt     240
tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag     300
gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag     360
acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc     420
```

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgc tgaagctgca gccaaagaag ctgcagccaa agaggccgca 1380

gctaaggaag ccgcagcaaa agctaccggt gtccctgata aaactgtgag atggtgtgca 1440

gtgtcggagc atgaggccac taagtgccag agtttccgcg accatatgaa aagcgtcatt 1500

ccatccgatg gtcccagtgt tgcttgtgtg aagaaagcct cctaccttga ttgcatcagg 1560

gccattgcgg caaacgaagc ggatgctgtg acactggatg caggtttggt gtatgatgct 1620

tacctggctc ccaataacct gaagcctgtg gtggcagagt tctatgggtc aaaagaggat 1680

ccacagactt tctattatgc tgttgctgtg gtgaagaagg atagtggctt ccagatgaac 1740

cagcttcgag gcaagaagtc ctgccacacg ggtctaggca ggtccgctgg gtggaacatc 1800

cccataggct tactttactg tgacttacct gagccacgta aacctcttga gaaagcagtg 1860

gccaatttct tctcgggcag ctgtgcccct tgtgcggatg ggacggactt cccccagctg 1920

tgtcaactgt gtccagggtg tggctgctcc acccttaacc aatacttcgg ctactcagga 1980

gccttcaagt gtctgaagga tggtgctggg gatgtggcct ttgtcaagca ctcgactata 2040

tttgagaact tggcaaacaa ggctgacagg gaccagtatg agctgctttg cctggacaac 2100

acccggaagc cggtagatga atacaaggac tgccacttgg cccaggtccc ttctcatacc 2160

gtcgtggccc gaagtatggg cggcaaggag gacttgatct gggagcttct caaccaggcc 2220

caggaacatt ttggcaaaga caaatcaaaa gaattccaac tattcagctc tcctcatggg 2280

aaggacctgc tgtttaagga ctctgcccac gggtttttaa aagtcccccc caggatggat 2340

gccaagatgt acctgggcta tgagtatgtc actgccatcc ggaatctacg ggaaggcaca 2400

tgcccagaag ccccaacaga tgaatgcaag cctgtgaagt ggtgtgcgct gagccaccac 2460

gagaggctca agtgtgatga gtggagtgtt aacagtgtag ggaaaataga gtgtgtatca 2520

gcagagacca ccgaagactg catcgccaag atcatgaatg gagaagctga tgccatgagc 2580

ttggatggag ggtttgtcta catagcgggc aagtgtggtc tggtgcctgt cttggcagaa 2640

aactacaata agagcgataa ttgtgaggat acaccagagg cagggtattt tgctgtagca 2700

gtggtgaaga aatcagcttc tgacctcacc tgggacaatc tgaaaggcaa gaagtcctgc 2760

catacggcag ttggcagaac cgctggctgg aacatcccca tgggcctgct ctacaataag 2820

atcaaccact gcagatttga tgaatttttc agtgaaggtt gtgcccctgg gtctaagaaa 2880

gactccagtc tctgtaagct gtgtatgggc tcaggcctaa acctgtgtga acccaacaac 2940

aaagagggat actacggcta cacaggcgct ttcaggtgtc tggttgagaa gggagatgtg 3000

gcctttgtga aacaccagac tgtcccacag aacactgggg gaaaaaaccc tgatccatgg 3060

gctaagaatc tgaatgaaaa agactatgag ttgctgtgcc ttgatggtac caggaaacct 3120

gtggaggagt atgcgaactg ccacctggcc agagccccga atcacgctgt ggtcacacgg 3180

aaagataagg aagcttgcgt ccacaagata ttacgtcaac agcagcacct atttggaagc 3240

aacgtaactg actgctcggg caacttttgt ttgttccggt cggaaaccaa ggaccttctg 3300

ttcagagatg acacagtatg tttggccaaa cttcatgaca gaaacacata tgaaaaatac 3360

ttaggagaag aatatgtcaa ggctgttggt aacctgagaa aatgctccac ctcatcactc 3420

ctggaagcct gcactttccg tagaccttaa 3450

<210> 23
<211> 3426
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia génica que codifica la proteína FVII-GS1-T-Tf

<400> 23
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggatcc ctggtgccgc gcggcagcgg aggcggttca 1380

accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag 1440

tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct 1500

tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat 1560

gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag 1620

cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa gaggatccac agactttcta ttatgctgtt 1680

gctgtggtga agaaggatag tggcttccag atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc 1740

cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg aacatcccca taggcttact ttactgtgac 1800

ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt 1860

gccccttgtg cggatgggac ggacttcccc cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc 1920

tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt 1980

gctggggatg tggcctttgt caagcactcg actatatttg agaacttggc aaacaaggct 2040

gacagggacc agtatgagct gctttgcctg gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac 2100

aaggactgcc acttggccca ggtcccttct cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc 2160

aaggaggact tgatctggga gcttctcaac caggcccagg aacattttgg caaagacaaa 2220

tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct catgggaagg acctgctgtt taaggactct 2280

gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg atggatgcca agatgtacct gggctatgag 2340

tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa 2400

tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg 2460

agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt gtatcagcag agaccaccga agactgcatc 2520

gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc atgagcttgg atggagggtt tgtctacata 2580

gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg gcagaaaact acaataagag cgataattgt 2640

gaggatacac cagaggcagg gtattttgct gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac 2700

ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct 2760

ggctggaaca tccccatggg cctgctctac aataagatca accactgcag atttgatgaa 2820

tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt 2880

atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc aacaacaaag agggatacta cggctacaca 2940

ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc 3000

ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac 3060

tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac 3120

ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac 3180

aagatattac gtcaacagca gcacctattt ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac 3240

ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac cttctgttca gagatgacac agtatgtttg 3300

gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct 3360

gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga 3420

ccttaa 3426

<210> 24
<211> 3417
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia génica que codifica la proteína FVII-GS1-T-Tf(M3)

<400> 24
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccggtggagg cggatccctg gtgccgcgcg gcagcggagg cggttcagtc 1380

cctgataaaa ctgtgagatg gtgtgcagtg tcggagcatg aggccactaa gtgccagagt 1440

ttccgcgacc atatgaaaag cgtcattcca tccgatggtc ccagtgttgc ttgtgtgaag 1500

aaagcctcct accttgattg catcagggcc attgcggcaa acgaagcgga tgctgtgaca 1560

ctggatgcag gtttggtgta tgatgcttac ctggctccca ataacctgaa gcctgtggtg 1620

gcagagttct atgggtcaaa agaggatcca cagactttct attatgctgt tgctgtggtg 1680

aagaaggata gtggcttcca gatgaaccag cttcgaggca agaagtcctg ccacacgggt 1740

ctaggcaggt ccgctgggtg gaacatcccc ataggcttac tttactgtga cttacctgag 1800

ccacgtaaac ctcttgagaa agcagtggcc aatttcttct cgggcagctg tgcccttgt 1860

gcggatggga cggacttccc ccagctgtgt caactgtgtc cagggtgtgg ctgctccacc 1920

cttaaccaat acttcggcta ctcaggagcc ttcaagtgtc tgaaggatgg tgctggggat 1980

gtggcctttg tcaagcactc gactatattt gagaacttgg caaacaaggc tgacagggac 2040

cagtatgagc tgctttgcct ggacaacacc cggaagccgg tagatgaata caaggactgc 2100

cacttggccc aggtcccttc tcataccgtc gtggcccgaa gtatgggcgg caaggaggac 2160

ttgatctggg agcttctcaa ccaggcccag gaacattttg gcaaagacaa atcaaaagaa 2220

ttccaactat tcagctctcc tcatgggaag gacctgctgt ttaaggactc tgcccacggg 2280

tttttaaaag tccccccccag gatggatgcc aagatgtacc tgggctatga gtatgtcact 2340

gccatccgga atctacggga aggcacatgc ccagaagccc caacagatga atgcaagcct 2400

gtgaagtggt gtgcgctgag ccaccacgag aggctcaagt gtgatgagtg gagtgttaac 2460

agtgtaggga aaatagagtg tgtatcagca gagaccaccg aagactgcat cgccaagatc 2520

atgaatggag aagctgatgc catgagcttg gatggagggt ttgtctacat agcgggcaag 2580

tgtggtctgg tgcctgtctt ggcagaaaac tacaataaga gcgataattg tgaggataca 2640

ccagaggcag ggtattttgc tgtagcagtg gtgaagaaat cagcttctga cctcacctgg 2700

gacaatctga aaggcaagaa gtcctgccat acggcagttg gcagaaccgc tggctggaac 2760

atccccatgg gcctgctcta caataagatc aaccactgca gatttgatga atttttcagt 2820

gaaggttgtg cccctgggtc taagaaagac tccagtctct gtaagctgtg tatgggctca 2880

ggcctaaacc tgtgtgaacc caacaacaaa gagggatact acggctacac aggcgctttc 2940

aggtgtctgg ttgagaaggg agatgtggcc tttgtgaaac accagactgt cccacagaac 3000

actgggggaa aaaaccctga tccatgggct aagaatctga atgaaaaaga ctatgagttg 3060

ctgtgccttg atggtaccag gaaacctgtg gaggagtatg cgaactgcca cctggccaga 3120

gccccgaatc acgctgtggt cacacggaaa gataaggaag cttgcgtcca caagatatta 3180

cgtcaacagc agcacctatt tggaagcaac gtaactgact gctcgggcaa cttttgtttg 3240

ttccggtcgg aaaccaagga ccttctgttc agagatgaca cagtatgttt ggccaaactt 3300

catgacagaa acacatatga aaaatactta ggagaagaat atgtcaaggc tgttggtaac 3360

ctgagaaaat gctccacctc atcactcctg gaagcctgca ctttccgtag accttaa 3417

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

<220>
<223> Cebador de FVII-F

<400> 25
aggggcagca ctgcagagat ttcat 25

<210> 26
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de FVII-R

<400> 26
tatgggattt ggtgccagga cagtt 25

<210> 27
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de FVII-S1

<400> 27
aattgctagc atggtctccc aggccctcag g 31

<210> 28
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de FVII-AS1

<400> 28
aattaccggt gggaaatggg gctcgcagga g 31

<210> 29
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de Tf-S1

<400> 29
atataccggt gtccctgata aaactgtgag atg 33

<210> 30
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de Tf-AS1

<400> 30
aattctcgag ttaaggtcta cggaaagtgc aggc 34

<210> 31
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de GS-FV-AS1

<400> 31
ggatccgcct ccaccgggaa atggggctcg caggag 36

<210> 32
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de GS-Tf-S1

<400> 32
ggtggaggcg gatccgtccc tgataaaact gtgagatggt 40

<210> 33
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de GS3-S

<400> 33
ccggtggagg cggttcaggc ggaggtggct ctggcggtgg cggatcca 48

<210> 34
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de GS3-AS

<400> 34
acctccgcca agtccgcctc caccgagacc gccaccgcct aggtggcc 48

<210> 35
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Unidad de enlazador GS-2

<400> 35
tattagatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc accggtatta 50

<210> 36
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador GS1bc

<400> 36
aattaccggt ggaggcggat ccctggtgcc gcgcggcagc ggaggcggtt caaccggtat 60

60

<210> 37
<211> 58
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de enlazador helicoidal S

<400> 37
aattaccggt gctgaagctg cagccaaaga agctgcagcc aaagaggccg cagctaag 58

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

<220>
<223> Cebador de enlazador helicoidal AS

<400> 38
ttataccggt agcttttgct gcggcttcct tagctgcggc ctcttt 46

<210> 39
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de albúmina-S

<400> 39
gtgggatccg atgcacacaa gagtgaggtt g 31

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

<220>
<223> Cebador de albúmina-AS

<400> 40
cacggatccc tataagccta aggcagcttg acttg 35

<210> 41
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido 1

<400> 41
gtgctcgagc gggggatctg gcgggtctgg aggctctgga gggtcgggag gctct 55

<210> 42
<211> 74
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido 2

<400> 42
caagggccct tatcaggatc ccgaccctcc agacccgcca gatcccccag agcctccaga 60

gcctcccgac cctc 74

<210> 43
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de mut FVII(XhoI)-S

<400> 43
gagccccatt tccctcgagc ccagcagccc tgg 33

<210> 44
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de mut FVII(XhoI)-AS

<400> 44
ccagggctgc tgggctcgag ggaaatgggg ctc 33

<210> 45
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador GS (dcoumento EP1816201)

<400> 45
Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser
20 25 30

<210> 46
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Nhe-Tf

<400> 46
aattgctagc atgaggctcg ccgtg 25

<210> 47
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Tf-Age

<400> 47
aattaccggt aggtctacgg aaagtgca 28

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

<220>
<223> Cebador Age-VII

<400> 48
aattaccggt gccaacgcgt tcctg 25

<210> 49
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador VII-Xho

<400> 49
aattctcgag ttagggaaat ggggctcg 28

<210> 50
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador TG del-S

<400> 50
cagcggaggc ggttcagtcc ctgataaaac tg 32

<210> 51
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador TG del-AS

<400> 51
cagttttatc agggactgaa ccgcctccgc tg 32

<210> 52
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador T del-S

<400> 52
cgagccccat ttcccggtgg aggcggatc 29

<210> 53
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador T del-AS

<400> 53
gatccgcctc caccgggaaa tggggctcg 29

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende factor VII (FVII) y transferrina, en la que dicha transferrina se une con el extremo C de dicho FVII, en la que dicha proteína de fusión comprende además un enlazador entre el FVII y la transferrina, en la que dicho FVII es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 95 % de homología con la SEQ ID NO: 1, y en la que dicha transferrina es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 95 % de homología con la SEQ ID NO: 2.

2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que dicho FVII es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

3. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicha transferrina es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

4. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un sitio de escisión de proteasa entre el extremo C de dicho FVII y dicha transferrina y en la que dicha proteasa es abundante en un tejido lesionado.

5. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el enlazador consiste en de 1 a 100 aminoácidos, de 1 a 75 aminoácidos o de 5 a 25 aminoácidos.

6. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 11 o en la que el enlazador comprende un sitio de escisión de trombina, factor Xa, factor IXa o factor VIIa.

7. La proteína de fusión de la reivindicación 6, en la que el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

8. Un ADN que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. El ADN de la reivindicación 8, en el que el DNA tiene la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 13 a 24.

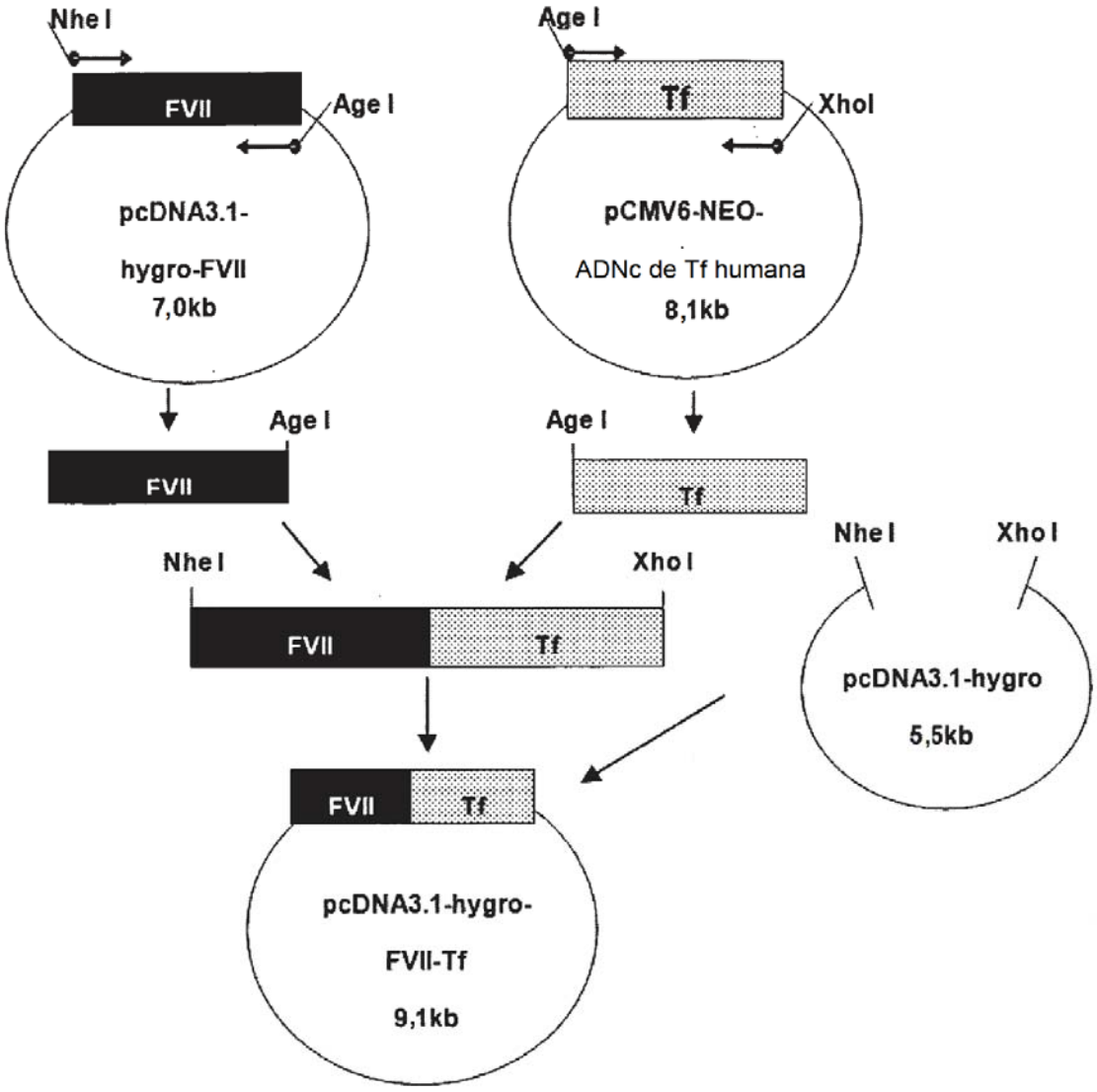
10. Un vector recombinante que comprende el DNA de la reivindicación 8.

11. Una célula hospedadora que comprende el vector recombinante de la reivindicación 10.

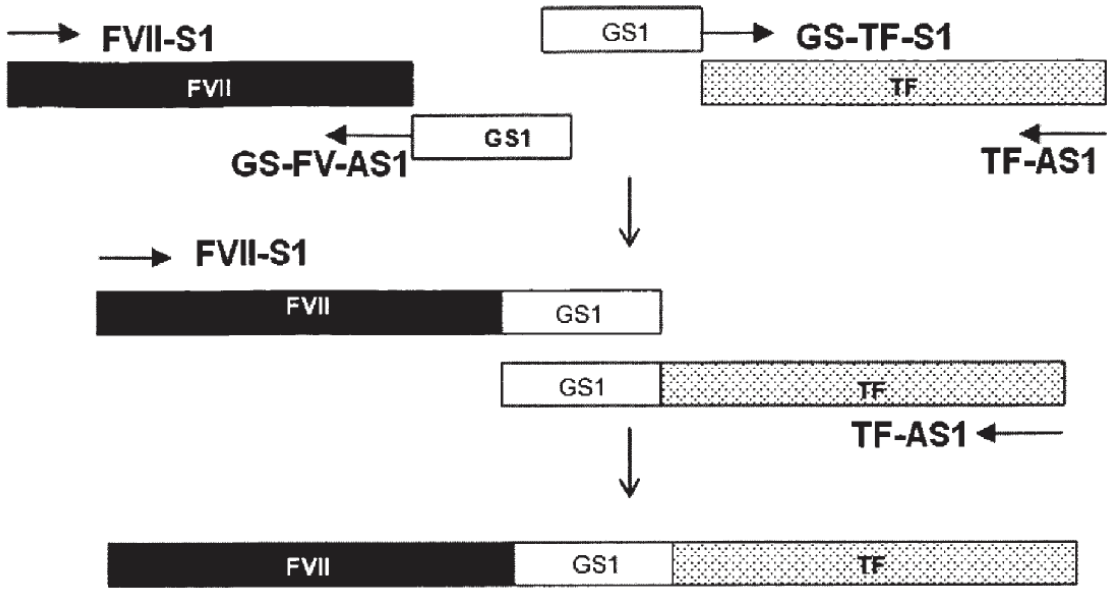
12. La célula hospedadora de la reivindicación 11, en la que la célula se selecciona entre el grupo que consiste en célula CHO, célula BHK21, célula HEK293 y célula Hep G2.

13. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en terapia.

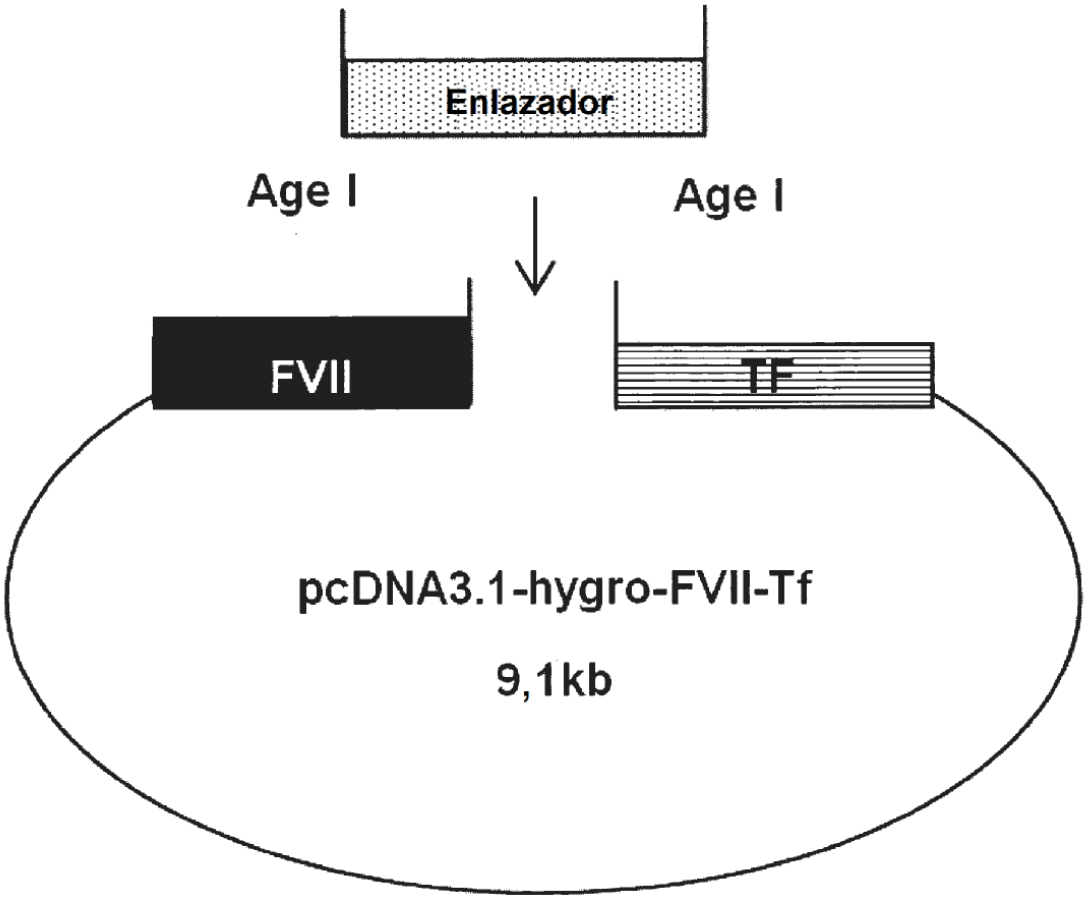
[Fig.1]


Nhe I
FVII
Age I
pcDNA3.1-
hygro-FVII
7,0kb
Age I
Tf
XhoI
pCMV6-NEO-
ADNc de Tf humana
8,1kb
Age I
FVII
Age I
Tf
Nhe I
Xho I
FVII
Tf
Nhe I
Xho I
pcDNA3.1-hygro
5,5kb
FVII
Tf
pcDNA3.1-hygro-
FVII-Tf
9,1kb

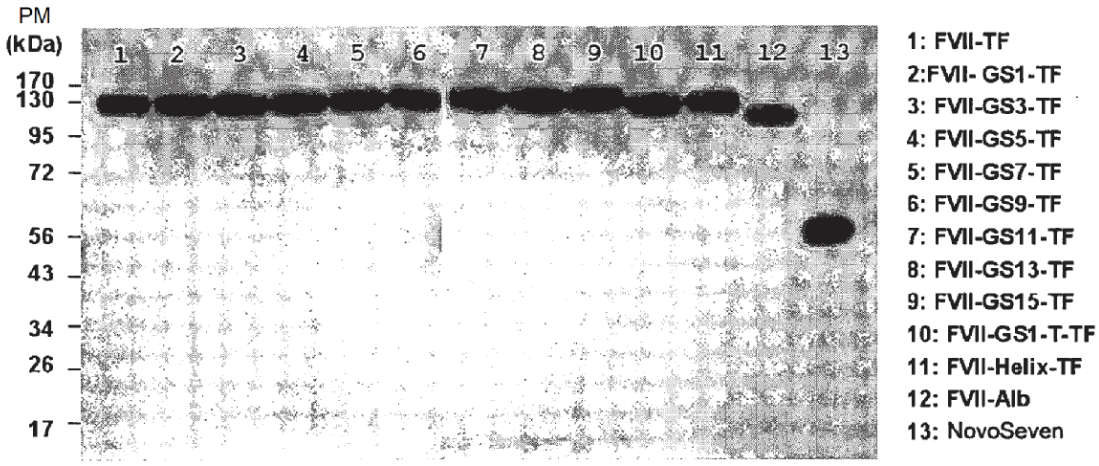
[Fig. 2]


FVII-S1
FVII
GS1
GS-TF-S1
TF
GS-FV-AS1
GS1
TF-AS1
FVII-S1
FVII
GS1
GS1
TF
TF-AS1
FVII
GS1
TF

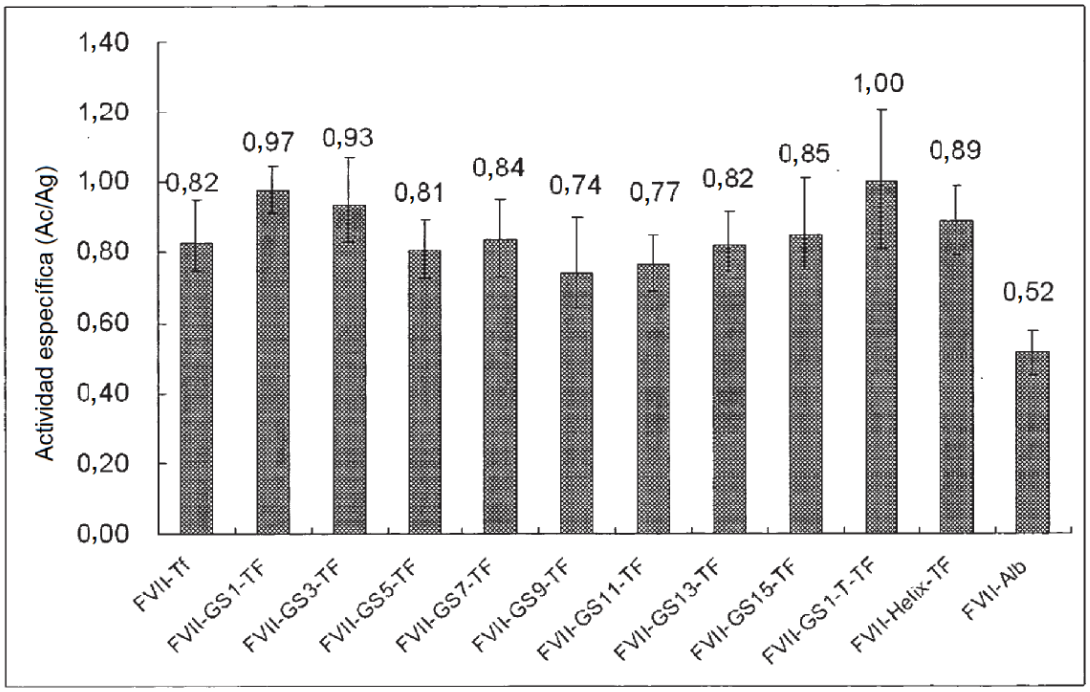
[Fig.3]


Enlazador
Age I
Age I
FVII
TF
pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf
9,1kb

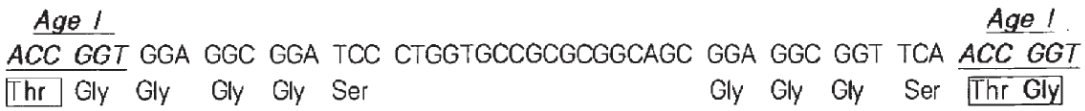
[Fig.4]



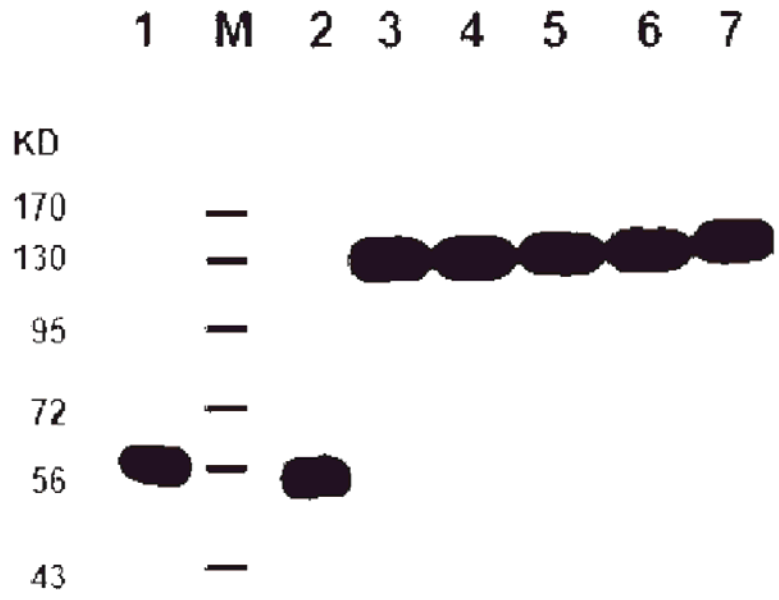
[Fig.5]



[Fig.6]



[Fig. 7]



1: NovoSeven
2: FVII
3: FVII-Tf
4: FVII-GS1-Tf
5: FVII-GS1-T-Tf
6: FVII-GS3-Tf
7: FVII-GS15-Tf