

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 478**

51 Int. Cl.:

A61K 38/37 (2006.01)

A61K 35/14 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2011 PCT/US2011/059297**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061689**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2011 E 11838863 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2635297**

54 Título: **Nueva variante del factor VIII antihemofílico que tiene actividad específica aumentada**

30 Prioridad:

05.11.2010 US 410437 P

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

31.07.2019

73 Titular/es:

**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)
1200 Lakeside Drive
Bannockburn, IL 60015, US y
BAXALTA GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LAI, CHEE KONG y
STAFFORD, RODDY, KEVIN**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 721 478 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nueva variante del factor VIII antihemofílico que tiene actividad específica aumentada

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuentra en el campo de los factores de coagulación sanguínea y hemofilia. Se refiere a una nueva variante del factor VIII antihemofílico (FVIII), designada en el presente documento rFVIIIv3, que tiene una actividad específica aumentada en comparación con los productos de factor VIII conocidos.

10

Antecedentes de la invención

La coagulación de la sangre comienza cuando las plaquetas se adhieren a la pared cortada de un vaso sanguíneo lesionado en el sitio de la lesión. Posteriormente, en una cascada de reacciones reguladas enzimáticamente, la enzima trombina convierte las moléculas de fibrinógeno solubles en cadenas insolubles de fibrina que mantienen unidas a las plaquetas en un trombo. En cada etapa de la cascada, un precursor variante se convierte en una proteasa que escinde el siguiente precursor variante en la serie. Se requieren cofactores en la mayoría de las etapas.

15

20

El factor VIII (también denominado factor VIII antihemofílico o FVIII) circula como un precursor inactivo en la sangre, unido estrechamente y no covalentemente al factor de von Willebrand. El factor VIII se activa proteolíticamente por la trombina o factor Xa, que lo disocia del factor de von Willebrand y activa su función procoagulante en la cascada. En su forma activa, el factor variante VIIIa es un cofactor que aumenta la eficiencia catalítica del factor IXa hacia la activación del factor X en varios órdenes de magnitud.

25

30

La clonación del FVIII humano ha revelado que la variante contiene 2332 aminoácidos organizados dentro de varios dominios con la secuencia A1-A2-B-A3-C1-C2 (Vehar *et al.*, 1984, Nature 312, 337-342; Toole *et al.*, 1984, Nature 312, 342-347 y Wood *et al.*, 1984, Nature 312, 330-337). La mayor parte del FVIII es heterodimérico en plasma, que contiene una cadena ligera y diversos derivados de cadena pesada. La estructura heterodimérica se debe a la escisión proteolítica del precursor en la arginina¹⁶⁴⁸, dando como resultado cadenas pesadas y ligeras que comprenden A1-A2-B y A3-C1-C2, respectivamente. La heterogeneidad dentro de la cadena pesada se explica por una proteólisis limitada dentro de su dominio B carboxi-terminal.

35

Para funcionar como un cofactor para la activación del factor X, el FVIII requiere una proteólisis limitada por el factor Xa o trombina. Esta activación implica la escisión en arginina en las posiciones 372 y 740 en la cadena pesada y en la posición 1689 en la cadena ligera. Se ha establecido que, en comparación con el precursor inactivo, el cofactor activo de FVIII carece de un fragmento de cadena ligera 1649-1689 y el dominio B completo (Mertens *et al.* 1993).

40

45

Las personas con deficiencias en el factor VIII o los anticuerpos contra el factor VIII que no se tratan con el factor VIII padecen una hemorragia interna no controlada que puede provocar una variedad de síntomas graves, desde reacciones inflamatorias en las articulaciones hasta la muerte temprana. Los hemofílicos graves, que suman alrededor de 10.000 personas en los Estados Unidos, pueden tratarse con una infusión de factor VIII humano, lo que restablecerá la capacidad de coagulación normal de la sangre si se administra con suficiente frecuencia y concentración. La definición clásica de factor VIII, de hecho, es la sustancia presente en el plasma sanguíneo normal que corrige el defecto de coagulación en el plasma derivado de individuos con hemofilia A.

50

Varias preparaciones de factor VIII derivado de plasma humano de diversos grados de pureza están disponibles comercialmente para el tratamiento de la hemofilia A. Estas incluyen un factor VIII parcialmente purificado derivado de la sangre agrupada de muchos donantes que es tratada con calor y detergente para virus pero contiene un nivel significativo de variantes antigénicas; un factor VIII purificado por anticuerpos monoclonales que tiene niveles más bajos de impurezas antigénicas y contaminación viral; y el factor VIII humano recombinante.

55

El desarrollo de anticuerpos ("inhibidores" o "anticuerpos inhibidores") que inhiben la actividad del factor VIII es una complicación grave en la gestión de pacientes con hemofilia.

60

65

Los aloanticuerpos se desarrollan en aproximadamente el 20 % de los pacientes con hemofilia A en respuesta a infusiones terapéuticas de factor VIII. En pacientes no tratados previamente con hemofilia A que desarrollan inhibidores, el inhibidor generalmente se desarrolla dentro del año de tratamiento. Además, los anticuerpos (autoanticuerpos) que inactivan el factor VIII ocasionalmente se desarrollan en individuos con niveles de factor VIII previamente normales. Si el título del inhibidor es lo suficientemente bajo, los pacientes pueden gestionarse aumentando la dosis de factor VIII. Sin embargo, a menudo el título de inhibidores es tan alto que no puede ser superado por el factor VIII. Una estrategia alternativa es evitar la necesidad de factor VIII durante la hemostasia normal usando preparaciones de concentrado de complejo de protrombina activada (por ejemplo, KONYNE (Cutter Laboratories), FEIBA (Baxter Healthcare), PROPLEX (Baxter Healthcare)) o factor humano recombinante VIIIa. Además, dado que el factor VIII porcino generalmente tiene una reactividad con los inhibidores sustancialmente menor que el factor VIII humano, se ha usado una preparación de factor VIII porcino parcialmente purificada

(HYATE: C (IPSEN Pharma)). Muchos pacientes que han desarrollado anticuerpos inhibidores contra el factor VIII humano han sido tratados exitosamente con factor VIII porcino y han tolerado dicho tratamiento durante largos periodos de tiempo.

5 Sin embargo, las preocupaciones de salud pública con respecto al riesgo de virus u otros contaminantes transmitidos por la sangre han limitado la utilidad del factor VIII porcino purificado de la sangre porcina. Por tanto, se ha desarrollado una variante del factor VIII porcino recombinante, que se denomina "OBI-1" y se describe, por ejemplo en el documento WO 01/68109. OBI-1 es un FVIII porcino con el dominio B parcialmente delecionado. Esta molécula se encuentra actualmente en desarrollo clínico.

10 Se sabe que las variantes del factor VIII con el dominio B delecionado mantienen la actividad procoagulante y cofactor del factor VIII. Además de esto, Mertens *et al.* (British Journal of Hematology 1993, 85, 133-142) describen variantes del factor VIII humano recombinantes que carecen del dominio B y la secuencia de la cadena pesada que abarca desde la lisina 713 hasta la arginina 740.

15 Muchos hemofílicos requieren el reemplazo diario del factor VIII para evitar la hemorragia y la artropatía hemofílica deformante resultante. En vista de esto, existe la necesidad de una molécula de factor VIII más potente.

Sumario de la invención

20 Tal como se establece en la reivindicación 1, la invención se refiere a una variante del factor VIII (FVIII) aislada y recombinante, con el dominio B total o parcialmente delecionado, comprendiendo la variante de FVIII una secuencia que es al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO.1; y estando desprovista de una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 716 a 742 del factor VIII porcino tal como se representa en la figura 2 o los aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7, correspondiendo esta última secuencia de 27 aminoácidos a DIGDYDNTYEDIPGFLLSGKNVIEPR (SEQ ID NO: 10). En otra realización, los 27 aminoácidos correspondientes a NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR (SEQ ID NO: 11) se delecionan.

30 En otra realización, la invención se refiere a una variante de FVII porcino aislada, recombinante, con el dominio B total o parcialmente delecionado desprovista completamente de los 27 aminoácidos correspondientes a DIGDYDNTYEDIPGFLLSGKNVIEPR (SEQ ID NO: 10).

35 En otra realización, la memoria descriptiva se refiere a una variante de FVII humano aislada, recombinante, con el dominio B total o parcialmente delecionado desprovista completamente de los 27 aminoácidos correspondientes a NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR (SEQ ID NO: 11).

40 En otra realización, la memoria descriptiva se refiere a una variante de FVII canino aislada, recombinante, con el dominio B total o parcialmente delecionado desprovista completamente de los 27 aminoácidos correspondientes a NIDDYYEDTYEDIPTLLNENNVIKPR (SEQ ID NO: 12).

45 Un segundo aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido tal como se define en el primer aspecto y las realizaciones descritas.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende un polinucleótido tal como se define en el segundo aspecto.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una célula de mamífero que comprende un vector de expresión tal como se define en el tercer aspecto.

50 En un quinto aspecto, la invención se refiere a un método para producir un FVIII tal como se define en el primer aspecto, que comprende las etapas de:

a. cultivar una célula de mamífero según el cuarto aspecto; y

55 b. aislar de la célula de mamífero la variante de FVIII.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una variante de FVIII tal como se define en el primer aspecto.

60 En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento de un paciente que padece hemofilia que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de variante de FVIII según el primer aspecto de la invención a un paciente que lo necesita, tratando de ese modo la hemofilia en dicho paciente.

65 En un octavo aspecto, la invención se refiere a una variante de FVIII según el primer aspecto para su uso en el tratamiento de hemofilia.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la cantidad de proteína en μg por dosis requerida para 5 productos de FVIII conocidos (columnas en blanco) y la nueva rpFVIIIv3 (columna rayada). BDD = dominio B deletado; FL = longitud completa; $u = \mu$;

5 las figuras 2 a-e son continuaciones de la misma secuencia. La figura 2a-e muestra una alineación de secuencia entre las secuencias de factor VIII de humanos (*Homo sapiens*), cerdo (*Sus scrofa*), ratón (*Mus musculus*) y perro (*Canis familiaris*). Esta alineación de secuencia se toma de HADB (también conocido como HAMSTeRS) 2010, página de inicio de la base de datos de mutaciones de hemofilia A y un sitio de recursos para trabajos sobre el factor VIII (hadb.org.uk). La numeración sigue la secuencia humana y no es idéntica a los números de aminoácidos de las secuencias en la lista de secuencias. La secuencia en negrita y doblemente subrayada representa la secuencia que falta en las variantes FVIIIv3 recombinantes de la invención. La secuencia subrayada es la secuencia del dominio B. La secuencia resaltada en gris es la parte del dominio B que puede retenerse en las secuencias de FVIIIv3 con el dominio B parcialmente deletado de la invención; y

15 la figura 3 muestra el ejemplo típico del perfil de SEC de los patrones de calibración y la regresión lineal de la curva de calibración tal como se describe en el ejemplo 5.

Breve descripción de las secuencias

20 SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de FVIIIv3 porcina con el dominio B parcialmente deletado;

SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de una FVIIIv3 humana con el dominio B deletado;

25 SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de una FVIIIv3 canina con el dominio B deletado;

SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia del dominio B de FVIII porcino que puede estar presente en una molécula de FVIII con el dominio B parcialmente deletado de la invención (el denominado "ligador de dominio B");

30 SEQ ID NO: 5 muestra una secuencia de ligador de dominio B del dominio B de FVIII humano que puede estar presente en una molécula de FVIII con el dominio B parcialmente deletado de la invención;

SEQ ID NO: 6 muestra una secuencia de ligador de dominio B del dominio B de FVIII canino que puede estar presente en una molécula de FVIII con el dominio B parcialmente deletado de la invención;

35 SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de aminoácidos de FVIII porcino de longitud completa;

SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de aminoácidos de FVIII humano de longitud completa;

40 SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos de FVIII canino de longitud completa;

SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de 27 péptidos que corresponde a los aminoácidos 716 a 742 del factor VIII porcino tal como se representa en la figura 2 o los aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7;

45 SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia de 27 péptidos que corresponde a los aminoácidos 714 a 740 de factor VIII humano tal como se representa en la figura 2 o los aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 8; y

SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de 27 péptidos que corresponde a los aminoácidos 714 a 740 de factor VIII canino tal como se representa en la figura 2 o los aminoácidos 708 a 734 de SEQ ID NO: 9.

Descripción detallada de la invención

55 La invención se basa en el hallazgo de una variante de una proteína del factor VIII porcino recombinante con el dominio B parcialmente deletado que contiene una delección de 27 aminoácidos particular. Esta variante, que se designa en el presente documento rpFVIIIv3, ha demostrado tener una actividad específica aumentada en comparación con una proteína similar que contiene el tramo de 27 aminoácidos, concretamente un FVIII porcino recombinante con el dominio B parcialmente deletado denominado "OBI-1". OBI-1, su secuencia de aminoácidos y polinucleótidos que codifican OBI-1 se conocen, por ejemplo, del documento US 6.458.563.

60 La invención se refiere a una variante del factor VIII (FVIII) aislada, recombinante, con el factor B total o parcialmente deletado, en la que la variante de FVIII está desprovista de una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 716 a 742 del factor VIII porcino tal como se representa en la figura 2 o los aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7, tal como se describe en las reivindicaciones.

65 Además, la invención se refiere a una variante de FVIII aislada, recombinante, con el dominio B total o parcialmente deletado, estando la variante de FVIII desprovista de una secuencia de 27 aminoácidos correspondiente a los

aminoácidos 716 a 742 del factor VIII porcino tal como se representa en la figura 2 o los aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7, en donde pueden delecionarse 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos. En una variante, se delecionan 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 aminoácidos. En otra variante, se delecionan 27, 26, o 25 aminoácidos. En la variante rpFVIIIv3, se delecionan los 27 aminoácidos correspondientes a DIGDYDNTYEDIPGFLLSGKNVIEPR (SEQ ID NO: 10).

Además, la memoria descriptiva se refiere a una variante de FVIII aislada, recombinante, con el dominio B total o parcialmente delecionado, estando la variante de FVIII desprovista de una secuencia de 27 aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 714 a 740 de factor VIII humano tal como se representa en la figura 2 o los aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 8, en donde pueden delecionarse 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos. En una variante, se delecionan 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 aminoácidos. En otra variante, se delecionan 27, 26 o 25 aminoácidos. En una variante FVIIIv3 humana (rhFVIIIv3), se delecionan los 27 aminoácidos correspondientes a NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR (SEQ ID NO: 11).

Además, la invención se refiere a una variante de FVIII aislada, recombinante, con el dominio B total o parcialmente delecionado, estando la variante de FVIII desprovista de una secuencia de 27 aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 714 a 740 de factor VIII canino tal como se representa en la figura 2 o los aminoácidos 708 a 734 de SEQ ID NO: 9, en donde pueden delecionarse 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos. En una variante, se delecionan 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 aminoácidos. En otra variante, se delecionan 27, 26 o 25 aminoácidos. En una variante FVIIIv3 canina (rcFVIIIv3), se delecionan los 27 aminoácidos correspondientes a NIDDYYEDTYEDIPTLLNENNVIKPR (SEQ ID NO: 12).

Tales variantes tienen una actividad específica elevada en comparación con variantes similares que contienen la secuencia de 27 aminoácidos intacta. Preferiblemente, la actividad específica se aumenta en más del 25 % o el 30 % o el 35 % o el 40 % o el 45 % o el 50 % o el 55 % o el 60 %.

El término "actividad específica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la actividad que corregirá el defecto de coagulación de plasma deficiente en factor VIII humano. La actividad específica se mide en unidades de actividad de coagulación por miligramo de variante del factor VIII total en un ensayo convencional en el que el tiempo de coagulación del plasma deficiente en factor VIII humano se compara con el del plasma humano normal. Un ensayo convencional adecuado para medir la potencia de los productos de FVIII, que es aceptado por la FDA para concentrados de FVIII de alta pureza, se denomina ensayo de coagulación en una etapa (OSCA; véase el Ejemplo 5; Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM., Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests: a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic assay procedure, J Lab Clin Med, 1953; 41: 637-47; Brand JT, Measurement of factor VIII: a potential risk factor for vascular disease, Arch Pathol Lab Med, 1993; 117: 48-51; Preston FE, Kitchen S, Quality control and factor VIII assays, Haemophilia, 1998; 4: 651-3; National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS EE.UU.). Determination of factor coagulant activities; directriz aprobada, documento NCCLS H-48-A 1997; 17: 1-36). La cantidad de proteína FVIII presente en una muestra puede medirse, por ejemplo, por SEC HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión molecular).

Una unidad de actividad del factor VIII es la actividad presente en un mililitro de plasma humano normal. En el ensayo, cuanto más corto sea el tiempo de formación de coágulos, mayor será la actividad del factor VIII que se está sometiendo a ensayo. El factor VIII porcino tiene actividad de coagulación en un ensayo de factor VIII humano.

En línea con la presente invención, los términos "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente.

Estar "desprovisto de una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 716 a 742 tal como se representa en la figura 2" significa que los aminoácidos 716 y 742, así como los aminoácidos entre estas posiciones, se delecionan, es decir, no se incluyen, en la variante de FVIII de la invención. Este tramo de aminoácidos consiste, por tanto, en 27 aminoácidos, de los cuales están desprovistas las variantes de FVIII de la invención.

Las variantes del factor VIII de la invención se designan en el presente documento globalmente "variante(s) de FVIII" o "FVIIIv3" o "rFVIIIv3". Pueden ser de origen porcino, humano, canino, murino u otro cualquiera que sea apropiado para terapia humana o animal. La figura 2 representa una alineación de secuencia de secuencias de FVIII de origen humano, porcino, murino y canino.

La secuencia delecionada en las variantes de FVIII de la invención se destaca en negrita y con subrayado doble. Este tramo de aminoácidos puede identificarse para las variantes de FVIII de otras especies por el experto en la técnica alineando las secuencias de FVIII de especies adicionales con, por ejemplo, la secuencia porcina o humana y tomando los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 716 a 742 según la figura 2 de la presente solicitud de patente.

Las realizaciones de la invención se refieren a variantes de FVIII de origen porcino, humano o canino.

En una realización, la variante de FVIII según la invención comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, o una variante de la misma que comprende una secuencia que es al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 1. Se entiende que el 10 % de variabilidad se refiere a las secuencias fuera del tramo de aminoácidos delecionado, es decir, que la variante está completamente desprovista de DIGDYDNTYEDIPGFLLSGKNVIEPR (SEQ ID NO: 10), una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 716 a 742 del factor VIII porcino tal como se representa en la figura 2 o los aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7.

En una realización adicional, la variante de FVIII de la memoria descriptiva comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que comprende una secuencia que es al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 2. De nuevo, se entiende que la variante está completamente desprovista de una secuencia de aminoácidos NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR (SEQ ID NO: 11), correspondiente a los aminoácidos 714 a 740 del factor VIII humano tal como se representa en la figura 2 o los aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 8.

En aún una realización adicional, la variante de FVIII de la invención comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, o una variante de la misma que comprende una secuencia que es al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 3. De nuevo, se entiende que la variante está completamente desprovista de una secuencia de aminoácidos NIDDYYEDTYEDIPTLLNENNVIKPR (SEQ ID NO: 12) correspondiente a los aminoácidos 714 a 740 del factor VIII canino tal como se representa en la figura 2 o aminoácidos 708 a 734 de SEQ ID NO: 9.

Las variantes de FVIII de la invención también pueden comprender secuencias que son al menos el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99, el 99,5, el 99,6, el 99,7, el 99,8 o el 99,9 % idénticas a las secuencias de SEQ ID NO: 7, 8 o 9.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos polipéptidos/proteínas, las secuencias de aminoácidos se alinean con fines de comparación óptimos (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos para alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos). Los residuos de aminoácido en las posiciones de aminoácido correspondientes se comparan entonces. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = $n.^{\circ}$ de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$ de posiciones totales (por ejemplo, (posiciones solapantes) \times 100).

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl Acad Sci. EE.UU. 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl Acad Sci. EE.UU. 90: 5873-5877. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de variantes de BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas variantes de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede usarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Alternativamente, puede usarse PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, (1988) CABIOS 4: 11-17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede usarse una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Aún otro algoritmo útil para identificar regiones de similitud y alineación de secuencias locales es el algoritmo FASTA tal como se describe en Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl Acad Sci. USA 85: 2444-2448. Cuando se usa el algoritmo FASTA para comparar secuencias de nucleótidos o aminoácidos, puede usarse una tabla de residuos de peso PAM120, por ejemplo, con un valor de K-tupla de 2.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. En el cálculo del porcentaje de identidad, sólo se cuentan concordancias exactas.

La variante de FVIII de la invención puede tener el dominio B parcial o totalmente delecionado. Esto significa que o bien todo el dominio B se deleciona o bien una parte del dominio B se conserva en la variante de FVIII. La parte restante (conservada) del dominio B se selecciona, por ejemplo, de los aminoácidos 20, 15, 12, 10 o 5 N-terminales y los aminoácidos 20, 15, 12, 10 o 5 C-terminales del dominio B, fusionados en marco entre sí.

Por tanto, preferiblemente, en las variantes de FVIII con el dominio B parcialmente delecionado de la invención, se eliminan porciones significativas del dominio B de aproximadamente 900 aminoácidos. En realizaciones de la

invención, menos del 5 % o menos del 4 % o menos del 3 % o menos del 2 % o menos del 1 % del dominio B permanece presente en las variantes de FVIII.

5 En realizaciones de la invención, la porción restante del dominio B se selecciona de una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido/proteína tal como se describió anteriormente. Un polinucleótido puede ser una molécula de ARN o ADN cuya secuencia de nucleótidos incorpora información de codificación a una célula huésped para la secuencia de aminoácidos de la variante de la invención, según las relaciones conocidas del código genético.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende un polinucleótido tal como se describió anteriormente.

15 Un “vector de expresión” es un elemento de ADN, a menudo de estructura circular, que tiene la capacidad de replicarse de manera autónoma en una célula huésped deseada, o integrarse en un genoma de célula huésped y que también posee determinadas características bien conocidas que permiten la expresión de un ADN codificante insertado en la secuencia de vector en el sitio adecuado y en la orientación adecuada. Tales características pueden incluir, pero no se limitan a, una o más secuencias promotoras para dirigir el inicio de la transcripción del ADN
20 codificante y otros elementos del ADN tales como potenciadores, sitios de poliadenilación y similares, todos también conocidos en la técnica. El término “vector de expresión” se usa para denotar tanto un vector que tiene una secuencia codificante de ADN que debe expresarse insertada dentro de su secuencia, como un vector que tiene los elementos de control de expresión requeridos así dispuestos con respecto a un sitio de inserción que puede servir para expresar cualquier ADN codificante insertado en el sitio, todo tal como se conoce en la técnica. Por tanto, por
25 ejemplo, un vector que carece de un promotor puede convertirse en un vector de expresión mediante la inserción de un promotor combinado con un ADN codificante. Un vector de expresión, tal como se usa en el presente documento, también puede ser un vector viral.

30 La expresión de las variantes de FVIII recombinante de la invención se lleva a cabo preferiblemente en cultivos de células de mamífero.

35 Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una célula de mamífero que comprende un vector de expresión tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, células CHO (ovario de hámster chino) y células BHK (células de riñón de hámster cría) son células de mamífero que son células huésped adecuadas en el contexto de la presente invención.

Según otro aspecto de la invención, un método para producir una variante de FVIII de la invención comprende las etapas de:

- 40 a. cultivar una célula de mamífero tal como se describió anteriormente; y
b. aislar de la célula de mamífero la variante de FVIII.

45 En una realización, el método comprende además la etapa de

- c. formular la variante del factor VIII junto con excipientes apropiados para dar una composición farmacéutica.

50 Excipientes adecuados para administración humana o animal son, por ejemplo, compuestos de estabilización farmacéutica, conservantes, vehículos de administración y/o vehículos portadores. Una formulación adecuada para productos de factor VIII se describe, por ejemplo, en el documento WO 03/080108, que se incorpora como referencia en el presente documento.

55 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una variante de FVIII de la invención.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de tratamiento de un paciente que padece una deficiencia de factor VIII que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la variante de FVIII de la invención a un paciente que lo necesita, tratando de ese modo la deficiencia de factor VIII en dicho paciente.

60 El término “cantidad terapéuticamente eficaz” tal como se usa en el presente documento, significa el nivel de FVIII en el plasma de un paciente que tiene deficiencia de FVIII, que ha recibido una composición farmacéutica de la variante de FVIII, que es suficiente para presentar una mejora medible o un efecto protector en el paciente (por ejemplo, para detener hemorragia). Los pacientes con deficiencia de FVIII son normalmente pacientes con hemofilia A congénita, pero también incluyen a aquellos sujetos diagnosticados con “hemofilia adquirida”, un estado en el que
65 aquellos que no son hemofílicos congénitos desarrollan espontáneamente anticuerpos inhibidores de su FVIII, lo que crea una grave deficiencia de FVIII.

La invención también se refiere a una variante de FVIII de la invención tal como se describe en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de deficiencia de factor VIII.

5 El tratamiento puede tomar la forma de una administración intravenosa única de la composición o la administración periódica o continua durante un periodo prolongado de tiempo, según sea necesario. Preferiblemente, la administración de la variante de FVIII es por vía intravenosa.

10 “Deficiencia de factor VIII,” tal como se usa en el presente documento, incluye deficiencia en la actividad de coagulación provocada por la producción de factor VIII defectuoso, por la producción inadecuada o la no producción del factor VIII, o por la inhibición parcial o total del factor VIII por los inhibidores. La hemofilia A es un tipo de deficiencia de factor VIII que resulta de un defecto en un gen ligado a X y la ausencia o deficiencia de la variante de factor VIII que codifica.

15 Las variantes de FVIII de la invención se usan para tratar hemorragia no controlada debida a deficiencia de factor VIII (por ejemplo, hemorragia intraarticular, intracraneal o gastrointestinal) en hemofílicos.

En una realización de la invención, la deficiencia de factor VIII es hemofilia A.

20 En otra realización, la deficiencia de factor VIII es hemofilia adquirida.

En una realización, la deficiencia de factor VIII se trata en pacientes que han desarrollado anticuerpos contra FVIII humano.

25 Tal como se mencionó anteriormente, las variantes de FVIII de la invención tienen actividad específica aumentada. Por tanto, es posible administrar cantidades reducidas de variante de FVIII con el fin de tratar deficiencia de VIII según la presente invención. Las cantidades de variante de FVIII pueden reducirse en al menos el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 % en comparación con terapia con un producto de FVIII que no contiene la delección de hasta 27 aminoácidos de la invención.

30 Reducir la cantidad de terapia de variante de FVIII tiene la ventaja de la inmunogenicidad reducida esperada, es decir, se espera que la probabilidad de generación de anticuerpos inhibidores contra la terapia de reemplazo con FVIII en el paciente se reduzca significativamente.

35 En una realización, una variante del factor VIII de la invención se administra en una cantidad de no más de 200 µg/dosis o 150 µg/dosis o 145 µg/dosis o 140 µg/dosis o 136 µg/dosis o 130 µg/dosis.

40 Habiendo descrito completamente esta invención, los expertos en la técnica apreciarán que la misma puede realizarse dentro de un amplio intervalo de parámetros, concentraciones y condiciones equivalentes sin apartarse del alcance de la invención y sin experimentación excesiva.

45 Si bien esta invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales. Esta solicitud está destinada a cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente divulgación como parte de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y como pueden aplicarse a las características esenciales expuestas en el presente documento anteriormente como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

50 La referencia a etapas de métodos conocidos, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no es de ninguna manera una admisión de que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención se divulgue, enseñe o sugiera en la técnica relevante.

55 La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará de manera tan completa la naturaleza general de la invención que otros pueden, mediante la aplicación de conocimientos dentro de la técnica (incluidos los contenidos de las referencias citadas en este documento), modificar y/o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones dichas realizaciones específicas, sin experimentación excesiva, sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por tanto, se pretende que tales adaptaciones y modificaciones estén dentro del significado de un intervalo de equivalentes de las realizaciones descritas, basadas en la enseñanza y la guía presentadas en el presente documento. Debe entenderse que la fraseología o terminología en el presente documento tiene el propósito de descripción y no de limitación, de manera que la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva debe ser interpretada por el experto en la materia a la luz de las enseñanzas y orientaciones presentadas en este documento, en combinación con el conocimiento de un experto en la técnica.

65 Ejemplos

Ejemplo 1: expresión de FVIII porcino recombinante con el dominio B parcialmente delecionado (OBI-1) y

aislamiento de tres proteínas variantes (rpVIIIv1, v2 y v3)

La expresión de OBI-1 en células BHK se llevó a cabo esencialmente tal como se describe en el documento US 6.458.563. Se detectaron tres variantes en el material producido (rpVIIIv1, v2 y v3). Se aislaron las variantes y se purificaron hasta >95 % de pureza con cromatografía de intercambio iónico. Para la purificación, se usó un sistema AKTA Explorer (AKTA Explorer 10, GE Healthcare Lifesciences n.º 17-5167-01) usando una columna de intercambio aniónico semipreparativa MonoQ HR10/10 (ahora Mono Q 10/100 GL, GE Healthcare Lifesciences n.º 17-5167-01). Se llevó a cabo elución en un gradiente con los dos tampones siguientes:

10 tampón A: TRIS 10 mM, pH 7,0, polisorbato 80 al 0,01 %

tampón B: tampón A y cloruro de sodio 1 M.

Las características del método de purificación se resumen en la tabla 1.

15

Tabla 1: método de purificación de la variante rpFVIII

Método AKTA:	LoopMQ1010	
Flujo:	4 ml/min	
Columna de equilibrio	8 CV	
Flujo de carga	4 ml/min	
Volumen de muestra	40-1000 ml	
Columna de lavado	10 CV	
Gradiente	Volumen de la columna (CV)	% de B
	7	45
	4	50
	4	50
	6	52
	4	52
	2	55
	7	60
	1	65
	5	65
	1	70
	5	70
	1	100
	7	100
	1	10
	4	10
Ejecución total	59 CV	
Temperatura de la columna	No controlada	

Ejemplo 2: la variante 3 (rpVIIIv3) tiene una actividad específica significativamente mayor que las variantes 1 y 2

20

La actividad específica de cada variante se evaluó dividiendo la potencia evaluada por un ensayo de coagulación de una etapa (OSCA) entre la concentración de proteína tal como se mide mediante el método de SEC HPLC. Los métodos de OSCA y SEC HPLC se llevaron a cabo tal como se describe en "Materiales y Métodos", ejemplo 5.

25 Resultados

Los resultados para las actividades específicas se indican en la tabla 2.

Tabla 2: actividades específicas (método de OSCA) para las variantes purificadas 1, 2 y 3 obtenidas de dos lotes diferentes de rpFVIII

5

Muestra basada en SEC	Unidades OSCA/ml	% de DER*	Unidades de actividad específica/ml	% de DER*
V1 - lote 1	1060	1,5	11956	1,7
V2 - lote 1	715	2,7	17267	3,3
V3 - lote 1	216	1,2	25926	2,8
OBI-1	513	1	18150	1,3
V1 - lote 2	980	1,2	12532	1,5
V2 - lote 2	613	0,6	16089	1,3
V3 - lote 2	280	2,9	19718	4,1
OBI-1	565	4,0	14427	4,4

*desviación estándar relativa

La observación de una actividad específica significativamente mayor para la variante 3 en el ensayo OSCA es distinta y uniforme. Dado que el método de OSCA es predictivo y representativo para el proceso de coagulación en humanos, se espera que la variante 3 sea un producto de valor significativo. Se espera que un aumento de 1,5-2,0 veces en la potencia reduzca la cantidad de FVIII administrado a los pacientes y, por tanto, podría reducir indirectamente la aparición de efectos secundarios inmunológicos.

10

Ejemplo 3: determinación de secuencia de rpFVIIIv3

La secuencia de v3 purificada se determinó mediante un mapa de péptidos seguido de CL-EM (cromatografía líquida de espectrometría de masas) y CL-EM/EM (cromatografía líquida de espectrometría de masas/espectrometría de masas) en un espectrómetro de masas Q-TOF Ultima, con MassLynx 4.0 (Waters Corporation, Milford, MA).

15

Aproximadamente 250 µg de variante 3 se concentraron usando un concentrador Amicon, Centricon YM-10 con un filtro de 10 000 MWCO (Millipore Corporation, Billerica, MA) hasta un volumen de <100 µl. Las muestras se mezclaron con 450 µl de HCl de guanidina 6 M/EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,002 M/tampón Tris 0,02 M pH 8 y se transfirieron a tubos de polipropileno de 2,0 ml. Se añadió DTT 1 M (ditiotreitól) a cada muestra hasta una concentración final de 10 mM y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Después de la reducción, se añadió yodoacetamida 2 M a cada tubo hasta una concentración final de 20 mM y se incubó durante una hora adicional a temperatura ambiente. Las muestras reducidas y alquiladas se transfirieron a casetes de diálisis y se dializaron durante 1 hora contra 1 l de tampón de diálisis de bicarbonato de amonio 50 mM que contenía urea 1,0 M, pH 8. Las muestras se dializaron luego contra 1 l de tampón de diálisis durante la noche a temperatura ambiente mientras se mantenía agitación constante. Después de la diálisis, los volúmenes finales fueron de aproximadamente 0,5 ml cada uno. Las muestras se dividieron en dos alícuotas de 125 µg.

20

25

Después de la diálisis, la muestra de proteína estaba contenida en una matriz que es óptima para la digestión proteolítica con tripsina. Se añadió tripsina a cada muestra en una razón de enzima con respecto a sustrato de 1:20 (p:p) y se incubó durante 8 horas a 37 °C. Todas las muestras se transfirieron a viales de HPLC y se analizaron por HPLC-EM.

30

La proteína reducida y alquilada se inyectó en una columna de fase inversa Vydac C18 (Grace, Deerfield, IL). Antes de la inyección de la muestra, se analizó una muestra en blanco (fase móvil A; agua desionizada que contiene ácido fórmico al 0,2 % (v:v)) para equilibrar la columna y demostrar la ausencia de picos de interferencia.

35

Los datos de espectrometría de masas se recogieron en un espectrómetro de masas Q-TOF API-US o un espectrómetro de masas Q-TOF Ultima (Waters Corporation, Milford, MA) usando ionización por electrospray (ESI) en el modo de ión positivo. Antes del análisis de la muestra, el espectrómetro de masas se calibró usando un ajuste de quinto orden en los iones del fragmento de péptido Glu-fibrinógeno que cubría un intervalo de 175 a 1285 m/z. Para que la calibración supere las especificaciones, se requirió un error de RMS (media cuadrática) para la masa de los fragmentos peptídicos de menos de 5 ppm. El paquete de software Masslynx 4.0™ SP2 y SP4 (Waters Corporation, Milford, MA) se usó para la adquisición y análisis de datos.

40

45

Tanto los datos de EM como los de EM/EM se recogieron usando una única ejecución de cromatografía líquida (CL)

Las exploraciones del estudio del espectrómetro de masas (EM) completo se recogieron desde 200-1950 m/z.

Se determinó que la secuencia de rpFVIII corresponde a SEC ID NO: 1. Esta secuencia contiene una delección de 27 aminoácidos en comparación con la secuencia OBI-1.

5

Ejemplo 4: rpFVIIIv3 tiene una actividad específica mayor que otros productos de FVIII conocidos

La actividad específica de rpFVIIIv3 se comparó con tres productos de FVIII disponibles comercialmente, concretamente Xynthia® (un FVIII humano recombinante con el dominio B delecionado de Wyeth Pharmaceuticals (Filadelfia, PA)), Kogenate FS® (un FVIII humano de longitud completa de Bayer Healthcare (Tarrytown, NY)) y Advate® (un FVIII humano de longitud completa de Baxter (Westlake Village, CA)), así como con OBI-1 (un FVIII porcino recombinante con el dominio B parcialmente delecionado), que actualmente se encuentra bajo desarrollo clínico, y un factor VIII canino con el dominio B delecionado (Denise E. Sabatino *et.al.*, Recombinant canine B-domain-deleted FVIII exhibits high specific activity and is safe in the canine hemophilia A model, Blood, 12 de noviembre de 2009, vol. 114, n.º 20, págs. 4562-4565).

15

La actividad específica de OBI-1 y rpFVIIIv3 se determinó mediante los métodos tal como se describen en el ejemplo 5.

20

Los resultados se muestran en la tabla 3 y en la figura 1. Debido a su mayor actividad específica, pueden administrarse menores cantidades de rpVIIIv3 por dosis a un paciente. Se espera que esta disminución de la dosis lleve a una inmunogenicidad reducida, es decir, a una menor probabilidad de que los pacientes desarrollen anticuerpos inhibidores.

25

Tabla 3: actividades específicas de los productos FVIII en comparación con rpVIIIv3

	Actividad específica en UI/mg de proteína	Proteína Amt µg/dosis [^]
Xynthia	7500	400
Kogenate FS	4000	750
Advate	4000	750
OBI-1	11000	273
rpVIIIv3	22000	136
FVIII BDD canino*	34000	88

[^] Proteína Amt = xxx µg/dosis. Los números que se muestran en la columna para rpVIII13 significan que se requerirá una cantidad de 136 µg por dosis. Una dosis es la cantidad requerida para elevar el nivel del factor VIII en sangre desde el 0 % hasta el 100 %, es decir, cuanto mayor sea la actividad específica (XXX unidades/mg), menor será la cantidad (en términos de µg). Obsérvese que 1 mg = 1000 µg. Dado que una dosis típica es de 3000 unidades por paciente, la cantidad de proteína real requerida = 3000/22000 = 0,136 mg = 136 µg.

* BDD significa dominio B delecionado y FL significa longitud completa

En conclusión, estos resultados muestran que rpVIIIv3 tiene una actividad específica significativamente más alta que los productos sometidos a prueba que se comercializan actualmente, o están en desarrollo clínico, para la terapia de reemplazo con FVIII.

30

En particular, es muy sorprendente que una delección de 27 aminoácidos, presente en rpVIIIv3 pero no en OBI-1, lleve a un aumento del 50 % en la actividad específica (según lo medido por el ensayo OSCA).

Ejemplo 5: materiales y métodos

35

ENSAYO DE COAGULACIÓN DE UNA ETAPA – MÉTODO DE OSCA

1. Diluir el patrón de referencia en tampón de ensayo (plasma deficiente en factor VIII al 10 % + tampón de Owren Veronal, por litro, 28 mmol de barbitol sódico y 125 mmol de NaCl, pH 7,35) hasta la potencia objetivo de 1,0 unidades/ml.

40

2. Diluir los patrones de comprobación, los controles de actividad y las muestras en tampón de ensayo hasta la potencia objetivo.

5 3. Cargar el patrón de calibración (referencia) y reactivos en los pocillos apropiados dentro de un instrumento Symex. (Sysmex CA-1500, analizador de coagulación, Dade Behring n.º B4260-1500 (Siemens Corporation, Deerfield, IL)).

10 4. Cargar el patrón de comprobación, controles y muestras en estantes fuera del instrumento Sysmex.

5. La secuencia de ensayo se produce automáticamente dentro del instrumento tal como sigue:

a. Se diluyen 5 µl de muestra en 45 µl de tampón de ensayo dentro del tubo de reacción

15 b. Se añaden 50 µl de plasma deficiente en factor VIII al tubo de reacción

c. Se añaden 50 µl de reactivo de tiempo de tromboplastina parcial activado Dade Actin FS (fosfátidos de soja purificados en activador de ácido elálgico $1,0 \times 10^{-4}$ M, Dade Behring, Liederbach, Alemania) al tubo de reacción y se incuban durante 60 segundos.

20 d. Se añaden 50 µl de cloruro de calcio (0,025 M, Dade Behring, Liederbach, Alemania) al tubo de reacción y se incuban durante 240 segundos.

e. El tiempo de coagulación se mide hasta un tiempo máximo de 300 segundos.

25 6. El tiempo de coagulación se corrige entonces con la potencia generada por la curva de calibración de patrón de referencia.

MÉTODO DE HPLC DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (SEC)

30 Se usó y se usa normalmente un sistema de HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) o Waters Bioalliance (Waters Corporation, Milford, MA) para el método de exclusión molecular para la determinación de la concentración de proteína. La columna de exclusión molecular típica usada fue una columna Superdex 200 de GE (Superdex 200 10.300 GL, 10 × 300 mm, n.º de cat 17-5175-01 (GE Healthcare Lifesciences, Piscataway, NJ)). Un protocolo de ensayo general es tal como sigue:

35 1. Se preparó una fase móvil típica que contenía NaCl 400 mM con TRIS 20 mM, pH 7,4 y polisorbato 80 al 0,01 %.

40 2. La fase móvil se ejecutó a través del sistema y la columna de HPLC hasta que se observó el equilibrio de la línea de base.

3. Se ejecutaron patrones para establecer la idoneidad del sistema con un tiempo de ejecución típico de 30 minutos para cada muestra.

45 4. Se cargaron las muestras normalmente sobre un inyector automático con una temperatura de la cámara de control de 4 °C.

50 5. Se cargó un patrón de calibración de concentraciones conocidas que contiene diversas cantidades de muestras patrón, normalmente desde 1, 3, 5, 10 y 25 µg de proteína en la columna en volúmenes entre 10 y 50 µl.

6. También se cargaron muestras de concentraciones desconocidas en las columnas normalmente en volúmenes entre 30 y 50 µl.

55 7. Se programó el sistema de HPLC para ejecutar las muestras automáticamente según la configuración de secuencia.

8. El área pico de los patrones de calibración y las muestras desconocidas se determinaron basándose en detección de fluorescencia con excitación y emisión a 280 nm y 340 nm respectivamente.

60 9. Se generó una regresión lineal de los patrones de calibración y la concentración de la muestra desconocida se determinó contra esta curva de calibración.

En la figura 3 se muestra un ejemplo típico del perfil de SEC de los patrones de calibración y la regresión lineal de la curva de calibración.

65

Ejemplo 6: unión a factor de von Willebrand

El factor de Von Willebrand (vWF) es una glicoproteína multifuncional que circula en plasma como una forma multimérica en complejo con el factor VIII (complejo FVIII/vWF). El complejo FVIII/vWF sirve para proteger el FVIII unido de la proteólisis temprana en circulación *in vivo*.

Se usa cromatografía de exclusión molecular (SEC) para caracterizar la unión en complejos FIII/vWF. Se seleccionó una columna Superose 6 (Superose 6 10/300GL, GE Healthcare n.º 17-5172-01, velocidad de flujo = 0,5 ml/min) por su biocompatibilidad conocida y alto límite de exclusión de 40 millones de Dalton (tampón de formulación de fase móvil: CaCl₂ 2 mM, TRIS 10 mM pH 7,0, NaCl 300 mM, PSB-80 al 0,01 %, sacarosa 11 mM, citrato de trisodio 10 mM). Las diferencias en peso molecular entre factor de von Willebrand (dimérico a ~500 kD, n.º de cat Fitzgerald 30C-CP4003U, n.º de lote A09121050, peso molecular de monómero = 260 kD, conc. = 77 µg/ml) y rpFVIII (~160 kD) son suficientes para resolver las dos especies.

La estequiometría de unión se determinó mediante la titulación de una cantidad constante de vWF con cantidades crecientes de rpFVIII. El perfil de la formación de complejación entre rpFVIII y vWF se determinó a partir del cromatograma de SEC e integración de los picos apropiados. La forma soluble de las mezclas resultantes en el sobrenadante se usó para determinar el punto final de la complejación de la titulación con cantidades crecientes de rpFVIII. Los complejos más grandes y estables formados entre rpFVIII y vWF migran desde el tiempo de retención normal hasta el límite de exclusión de la columna. Cuando se produce la saturación, se observarán cantidades crecientes de rpFVIII no unido en el cromatograma de SEC. Este método se usa para distinguir diferencias y similitudes en las propiedades de las variantes.

Ejemplo 7: Cinética de digestión con trombinaSDS-PAGE

Las moléculas de factor VIII porcino recombinante (rpFVIII) son heterodímeros de aproximadamente 160 kD compuestos por una cadena ligera de peso molecular de 78,5 kD (A3-C1-C2, 765-1448) y una cadena pesada con un peso molecular que varía de 86,7 kD (A1-A2). La cadena pesada de rpFVIII es heterogénea y está compuesta por tres variantes principales que se forman tras la secreción de la célula y pueden ser escindidas por proteasas unidas a la membrana de la familia de subtilisinas designada PACE (enzima de escisión de aminoácidos básicos emparejados).

Al igual que el factor VIII humano, rpFVIII se transforma en una forma activa por proteólisis limitada a partir de trombina. La activación de trombina de rpFVIII es específica para el sitio de escisión de la cadena pesada en Arg (372)-Ser (373). La región de escisión para la Cadena Ligera en Arg (805)-Ser (806) libera una pequeña fracción peptídica de 40 aminoácidos que varía de 765-804 (~4,4 kD). La combinación de estas escisiones iniciales por trombina forma el factor VIII recombinante porcino activado como un heterotrímero de subunidades designado como A1 (~50 kD), A2 (~40 kD) y A3-C1-C2 (~70 kD). Las subunidades rpFVIII A1 y A3-C1-C2 escindidas retienen el enlace dependiente de ión metálico divalente, mientras que la subunidad A2 está débilmente asociada con el dímero A1-A3-C1-C2 principalmente por interacciones electrostáticas. En SDS-PAGE, estas subunidades se muestran como tres bandas distintas. La eficiencia en la conversión de rpFVIII (2 unidades peptídicas) en tres unidades peptídicas es característica de la activación de trombina del producto. Este método distingue la similitud y las diferencias entre las variantes individuales.

Pueden usarse y se usaron otros dos métodos ortogonales para mapear la cinética de la digestión con trombina del FVIII. Puede usarse HPLC de fase inversa desnaturizante; se espera que los perfiles de pico sean similares a los de SDS-PAGE. También puede usarse cromatografía de intercambio aniónico, que conserva la forma nativa de los péptidos.

HPLC de fase inversa

Equipo:

1. HPLC serie 1100: Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.; n.º de modelo 61312A, n.º de serie DE10907753.

2. Columna Poroshell 5 µm 2,1 × 75 mm: Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.; n.º de pieza 660750-909, n.º de serie USVV001988.

Reactivos:

1. tampón A: TFA al 0,1 % (JT B Baker, Phillisburg, NJ; n.º de cat 94700-00, n.º de lote J23J00) en agua

2. tampón B: TFA al 0,1 % en acetonitrilo (JT Baker, Phillisburg, NJ; n.º de cat 9017-03, n.º de lote J38807).

Procedimiento:

1. Equilibrar la columna durante 60 minutos usando el 99 % de A y el 1 % de B a 1 ml/min.
2. Las inyecciones de muestra fueron de 50 µl en volumen; se usaron 25 µl de patrón de referencia como control.
3. Un ejemplo del método usado para ejecutar las muestras se muestra en la tabla 4.

Tabla 4:

Inyección	Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% de A	% de B
1	0,00	2	99	1
2	2,00	2	99	1
3	3,00	2	64	36
4	3,50	2	64	36
5	4,00	2	61	39
6	5,00	2	61	39
7	5,10	2	58	42
8	6,50	2	58	42
9	6,51	2	56	44
10	7,20	2	56	44
11	7,21	2	40	60
12	8,50	2	40	60
13	8,51	2	10	90
14	9,00	2	10	90
15	9,10	2	99	1
16	10,00	2	99	1

Cromatografía de intercambio aniónico

Equipo:

1. AllianceBio HPLC, Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.; n.º de modelo 2796; n.º de serie M08BA1199M.
2. Columna Protein Pak Hi Res Q 5 µm 4,6 × 100 mm: Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.; n.º de pieza 186004931, n.º de serie 502N112561VE04.

Reactivos:

tampón A:

- base Tris 10 mM (1,211 g/l)
- cloruro de calcio 2 mM (0,588 g/l)
- polisorbato 80 al 0,01 % (1 ml de PS-80/l al 10 %)
- agua filtrada hasta 1 l, pH 7,0

tampón B:

- base Tris 10 mM (1,211 g/l)
- cloruro de calcio 2 mM (0,588 g/l)
- polisorbato 80 al 0,01 % (1 ml de PS-80/l al 10 %)

cloruro de sodio 1 M (58,44 g/l)

agua filtrada hasta 1 l, pH 7,0

5

Procedimiento:

1. Equilibrar la columna durante 60 min usando el 70 % de A y el 30 % de B a 0,5 ml/min

10

2. Las inyecciones de muestra fueron de 50 µl en volumen; se usaron 10 µl de patrón de referencia como control.

3. Un ejemplo del método usado para ejecutar las muestras se muestra en la tabla 5.

Tabla 5:

15

Inyección	Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% de A	% de B
1	0,01	0,5	70	30
2	0,50	0,5	70	30
3	3,50	0,5	60	40
4	5,00	0,5	60	40
5	10,00	0,5	30	70
6	10,10	0,5	1	99
7	12,00	0,5	1	99
8	12,10	0,5	70	30
9	17,00	0,5	70	30

El experto en la técnica conocerá y apreciará que estos y otros métodos pueden usarse para llegar a comprender las proteínas del factor VIII recombinante tal como se describe en el presente documento.

20 **Lista de secuencias**

<110> Ipsen Pharma S.A.S.

<120> Una nueva variante del factor VIII antihemofílico que tiene actividad específica aumentada

25

<130> IPH 021

<160> 12

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1421

<212> PRT

35

<213> *Sus scrofa*

<400> 1

ES 2 721 478 T3

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

Arg Gln Ser Glu Leu Leu Arg Glu Leu His Val Asp Thr Arg Phe Pro
 20 25 30

Ala Thr Ala Pro Gly Ala Leu Pro Leu Gly Pro Ser Val Leu Tyr Lys
 35 40 45

Lys Thr Val Phe Val Glu Phe Thr Asp Gln Leu Phe Ser Val Ala Arg
 50 55 60

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

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

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

Ala Glu Tyr Glu Asp His Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys
 115 120 125

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

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

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

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

	675					680						685			
Val	Leu 690	Gly	Cys	His	Asn	Ser 695	Asp	Leu	Arg	Asn	Arg 700	Gly	Met	Thr	Ala
Leu	Leu	Lys	Val	Tyr	Ser 710	Cys	Asp	Arg	Ser	Phe 715	Ala	Gln	Asn	Ser	Arg 720
Pro	Pro	Ser	Ala	Ser 725	Ala	Pro	Lys	Pro	Pro 730	Val	Leu	Arg	Arg	His 735	Gln
Arg	Asp	Ile	Ser 740	Leu	Pro	Thr	Phe	Gln 745	Pro	Glu	Glu	Asp	Lys 750	Met	Asp
Tyr	Asp	Asp 755	Ile	Phe	Ser	Thr	Glu 760	Thr	Lys	Gly	Glu	Asp 765	Phe	Asp	Ile
Tyr	Gly 770	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln 775	Asp	Pro	Arg	Ser	Phe 780	Gln	Lys	Arg	Thr
Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala 790	Ala	Val	Glu	Gln	Leu 795	Trp	Asp	Tyr	Gly	Met 800
Ser	Glu	Ser	Pro	Arg 805	Ala	Leu	Arg	Asn	Arg 810	Ala	Gln	Asn	Gly	Glu	Val 815
Pro	Arg	Phe	Lys 820	Lys	Val	Val	Phe	Arg 825	Glu	Phe	Ala	Asp	Gly 830	Ser	Phe
Thr	Gln	Pro 835	Ser	Tyr	Arg	Gly	Glu 840	Leu	Asn	Lys	His	Leu 845	Gly	Leu	Leu
Gly	Pro 850	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu 855	Val	Glu	Asp	Asn	Ile 860	Met	Val	Thr	Phe
Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg 870	Pro	Tyr	Ser	Phe	Tyr 875	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser 880
Tyr	Pro	Asp	Asp	Gln 885	Glu	Gln	Gly	Ala	Glu 890	Pro	Arg	His	Asn	Phe 895	Val
Gln	Pro	Asn	Glu 900	Thr	Arg	Thr	Tyr	Phe 905	Trp	Lys	Val	Gln	His 910	His	Met
Ala	Pro	Thr 915	Glu	Asp	Glu	Phe	Asp 920	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala 925	Tyr	Phe	Ser

ES 2 721 478 T3

Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu
 930 935 940

Leu Ile Cys Arg Ala Asn Thr Leu Asn Ala Ala His Gly Arg Gln Val
 945 950 955 960

Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys
 965 970 975

Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Val Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys
 980 985 990

His Leu Gln Met Glu Asp Pro Thr Leu Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His
 995 1000 1005

Ala Ile Asn Gly Tyr Val Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met
 1010 1015 1020

Ala Gln Asn Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser
 1025 1030 1035

Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Ser
 1040 1045 1050

Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Val Tyr Asn Leu Tyr
 1055 1060 1065

Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Val Gly
 1070 1075 1080

Ile Trp Arg Ile Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu Gln Ala Gly
 1085 1090 1095

Met Ser Thr Thr Phe Leu Val Tyr Ser Lys Glu Cys Gln Ala Pro
 1100 1105 1110

Leu Gly Met Ala Ser Gly Arg Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala
 1115 1120 1125

Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His
 1130 1135 1140

Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Asp Pro His Ser
 1145 1150 1155

Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile
 1160 1165 1170

ES 2 721 478 T3

Met Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser
 1175 1180 1185

Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Arg Asn Trp Gln Ser
 1190 1195 1200

Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn
 1205 1210 1215

Val Asp Ala Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile
 1220 1225 1230

Val Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg
 1235 1240 1245

Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys
 1250 1255 1260

Ser Met Pro Leu Gly Met Gln Asn Lys Ala Ile Ser Asp Ser Gln
 1265 1270 1275

Ile Thr Ala Ser Ser His Leu Ser Asn Ile Phe Ala Thr Trp Ser
 1280 1285 1290

Pro Ser Gln Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Thr Asn Ala Trp
 1295 1300 1305

Arg Pro Arg Val Ser Ser Ala Glu Glu Trp Leu Gln Val Asp Leu
 1310 1315 1320

Gln Lys Thr Val Lys Val Thr Gly Ile Thr Thr Gln Gly Val Lys
 1325 1330 1335

Ser Leu Leu Ser Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Val Ser Ser
 1340 1345 1350

Ser Gln Asp Gly Arg Arg Trp Thr Leu Phe Leu Gln Asp Gly His
 1355 1360 1365

Thr Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Ser Thr Pro Val Val
 1370 1375 1380

Asn Ala Leu Asp Pro Pro Leu Phe Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His
 1385 1390 1395

Pro Thr Ser Trp Ala Gln His Ile Ala Leu Arg Leu Glu Val Leu
 1400 1405 1410
 Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 1415 1420

<210> 2
 <211> 1397
 <212> PRT

5

ES 2 721 478 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

450					455					460					
Phe 465	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser 470	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile 475	Tyr	Pro	His	Gly	Ile 480
Thr	Asp	Val	Arg	Pro 485	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg 490	Leu	Pro	Lys	Gly	Val 495	Lys
His	Leu	Lys	Asp 500	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro 505	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys 510	Tyr	Lys
Trp	Thr	Val 515	Thr	Val	Glu	Asp	Gly 520	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp 525	Pro	Arg	Cys
Leu	Thr 530	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser 535	Phe	Val	Asn	Met	Glu 540	Arg	Asp	Leu	Ala
Ser 545	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro 550	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr 555	Lys	Glu	Ser	Val	Asp 560
Gln	Arg	Gly	Asn	Gln 565	Ile	Met	Ser	Asp	Lys 570	Arg	Asn	Val	Ile	Leu 575	Phe
Ser	Val	Phe	Asp 580	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp 585	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn 590	Ile	Gln
Arg	Phe	Leu 595	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly 600	Val	Gln	Leu	Glu	Asp 605	Pro	Glu	Phe
Gln	Ala 610	Ser	Asn	Ile	Met	His 615	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr 620	Val	Phe	Asp	Ser
Leu 625	Gln	Leu	Ser	Val	Cys 630	Leu	His	Glu	Val	Ala 635	Tyr	Trp	Tyr	Ile	Leu 640
Ser	Ile	Gly	Ala	Gln 645	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser 650	Val	Phe	Phe	Ser	Gly 655	Tyr
Thr	Phe	Lys	His 660	Lys	Met	Val	Tyr	Glu 665	Asp	Thr	Leu	Thr	Leu 670	Phe	Pro
Phe	Ser	Gly 675	Glu	Thr	Val	Phe	Met 680	Ser	Met	Glu	Asn	Pro 685	Gly	Leu	Trp
Ile 690	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser 695	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg 700	Gly	Met	Thr	Ala

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
 1205 1210 1215

Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly
 1220 1225 1230

Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys
 1235 1240 1245

Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn
 1250 1255 1260

Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln
 1265 1270 1275

Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu
 1280 1285 1290

Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val
 1295 1300 1305

Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys
 1310 1315 1320

Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu
 1325 1330 1335

Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
 1340 1345 1350

Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr
 1355 1360 1365

Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
 1370 1375 1380

Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 1385 1390 1395

<210> 3
 <211> 1397
 5 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 3

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

ES 2 721 478 T3

Met Gln Ser Asp Leu Leu Ser Ala Leu His Ala Asp Thr Ser Phe Ser
 20 25 30

Ser Arg Val Pro Gly Ser Leu Pro Leu Thr Thr Ser Val Thr Tyr Arg
 35 40 45

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

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

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

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

Ala Glu Tyr Glu Asp Gln Thr Ser Gln Lys Glu Lys Glu Asp Asp Asn
 115 120 125

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

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

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

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

Leu Gln Glu Phe Val Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser
 195 200 205

Trp His Ser Glu Thr Asn Ala Ser Leu Thr Gln Ala Glu Ala Gln His
 210 215 220

Glu Leu His Thr Ile Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu
 225 230 235 240

Thr Val Cys His Lys Arg Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly
 245 250 255

Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu

ES 2 721 478 T3

260					265					270					
Val	Arg	Asn 275	His	Arg	Gln	Ala	Ser 280	Leu	Glu	Ile	Ser	Pro 285	Ile	Thr	Phe
Leu	Thr 290	Ala	Gln	Thr	Phe	Leu 295	Met	Asp	Leu	Gly	Gln 300	Phe	Leu	Leu	Phe
Cys 305	His	Ile	Pro	Ser	His 310	Gln	His	Asp	Gly	Met 315	Glu	Ala	Tyr	Val	Lys 320
Val	Asp	Ser	Cys	Pro 325	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu 330	Arg	Met	Lys	Asn	Asn 335	Glu
Asp	Lys	Asp	Tyr 340	Asp	Asp	Gly	Leu	Tyr 345	Asp	Ser	Asp	Met	Asp 350	Val	Val
Ser	Phe	Asp 355	Asp	Asp	Ser	Ser	Ser 360	Pro	Phe	Ile	Gln	Ile 365	Arg	Ser	Val
Ala	Lys 370	Lys	His	Pro	Lys	Thr 375	Trp	Val	His	Tyr	Ile 380	Ala	Ala	Glu	Glu
Glu 385	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala 390	Pro	Ser	Gly	Pro	Thr 395	Pro	Asn	Asp	Arg	Ser 400
His	Lys	Asn	Leu	Tyr 405	Leu	Asn	Asn	Gly	Pro 410	Gln	Arg	Ile	Gly	Lys 415	Lys
Tyr	Lys	Lys	Val 420	Arg	Phe	Val	Ala	Tyr 425	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe 430	Lys	Thr
Arg	Glu	Ala 435	Ile	Gln	Tyr	Glu	Ser 440	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro 445	Leu	Leu	Tyr
Gly	Glu 450	Val	Gly	Asp	Thr	Leu 455	Leu	Ile	Ile	Phe	Lys 460	Asn	Gln	Ala	Ser
Arg 465	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr 470	Pro	His	Gly	Ile	Asn 475	Tyr	Val	Thr	Pro	Leu 480
His	Thr	Gly	Arg	Leu 485	Pro	Lys	Gly	Val	Lys 490	His	Leu	Lys	Asp	Met 495	Pro
Ile	Leu	Pro	Gly 500	Glu	Ile	Phe	Lys	Tyr 505	Lys	Trp	Thr	Val	Thr 510	Val	Glu

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Arg Ser Pro His Ile Leu Arg
 770 775 780
 Asn Arg Ala Gln Ser Gly Asp Val Gln Gln Phe Lys Lys Val Val Phe
 785 790 795 800
 Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu
 805 810 815
 Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val
 820 825 830
 Glu Asp Asn Ile Val Val Thr Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr
 835 840 845
 Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Asp Glu Asp Glu Gly Gln Gly
 850 855 860
 Ala Glu Pro Arg Arg Lys Phe Val Asn Pro Asn Glu Thr Lys Ile Tyr
 865 870 875 880
 Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp
 885 890 895
 Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val
 900 905 910
 His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Arg Ser Asn Thr Leu
 915 920 925
 Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Val
 930 935 940
 Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Leu
 945 950 955 960
 Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Val Gln Lys Glu Asp Pro Thr
 965 970 975
 Leu Lys Glu Asn Phe Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Val Lys Asp
 980 985 990
 Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Lys Val Arg Trp Tyr
 995 1000 1005
 Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
 1010 1015 1020

ES 2 721 478 T3

Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met
 1025 1030 1035

Ala Val Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met
 1040 1045 1050

Leu Pro Ser Gln Val Gly Ile Trp Arg Ile Glu Cys Leu Ile Gly
 1055 1060 1065

Glu His Leu Gln Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser
 1070 1075 1080

Lys Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg
 1085 1090 1095

Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
 1100 1105 1110

Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser
 1115 1120 1125

Thr Lys Asp Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro
 1130 1135 1140

Met Ile Ile His Gly Ile Met Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe
 1145 1150 1155

Ser Ser Leu Tyr Val Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp
 1160 1165 1170

Gly Asn Lys Trp His Ser Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu
 1175 1180 1185

Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn
 1190 1195 1200

Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Gln Tyr Ile Arg Leu His Pro
 1205 1210 1215

Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly
 1220 1225 1230

Cys Asp Phe Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys
 1235 1240 1245

Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Ser

ES 2 721 478 T3

1250 1255 1260

Met Leu Ala Thr Trp Ser Pro Ser Gln Ala Arg Leu His Leu Gln
 1265 1270 1275

Gly Arg Thr Asn Ala Trp Arg Pro Gln Ala Asn Asn Pro Lys Glu
 1280 1285 1290

Trp Leu Gln Val Asp Phe Arg Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Ile
 1295 1300 1305

Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Ile Ser Met Tyr Val Lys
 1310 1315 1320

Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Asn Trp Thr Leu
 1325 1330 1335

Phe Leu Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Arg Asp
 1340 1345 1350

Ser Ser Thr Pro Val Arg Asn Arg Leu Glu Pro Pro Leu Val Ala
 1355 1360 1365

Arg Tyr Val Arg Leu His Pro Gln Ser Trp Ala His His Ile Ala
 1370 1375 1380

Leu Arg Leu Glu Val Leu Gly Cys Asp Thr Gln Gln Pro Ala
 1385 1390 1395

<210> 4
 <211> 24
 5 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

<400> 4

Ser Phe Ala Gln Asn Ser Arg Pro Pro Ser Ala Ser Ala Pro Lys Pro
 1 5 10 15

10 Pro Val Leu Arg Arg His Gln Arg
 20

<210> 5
 <211> 24
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg Ser Gln Asn Pro
 1 5 10 15
 20 Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg
 20

<210> 6
 <211> 24
 <212> PRT

ES 2 721 478 T3

<213> *Canis familiaris*

<400> 6

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Lys Ser Gln Asn Pro
 1 5 10 15

5 Pro Val Ser Lys His His Gln Arg
 20

<210> 7

<211> 2114

<212> PRT

10 <213> *Sus scrofa*

<400> 7

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

Arg Gln Ser Glu Leu Leu Arg Glu Leu His Val Asp Thr Arg Phe Pro
 20 25 30

Ala Thr Ala Pro Gly Ala Leu Pro Leu Gly Pro Ser Val Leu Tyr Lys
 35 40 45

Lys Thr Val Phe Val Glu Phe Thr Asp Gln Leu Phe Ser Val Ala Arg
 50 55 60

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

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

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

Ala Glu Tyr Glu Asp His Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys
 115 120 125

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

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

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

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

Asp Val Thr Phe Lys Thr Arg Lys Ala Ile Pro Tyr Glu Ser Gly Ile
435 440 445

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

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

Thr Asp Val Ser Ala Leu His Pro Gly Arg Leu Leu Lys Gly Trp Lys
485 490 495

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

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

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Ile Asn Leu Glu Lys Asp Leu Ala
530 535 540

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

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

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

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

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

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

Ser Val Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr

ES 2 721 478 T3

			645					650					655			
Thr	Phe	Lys	His 660	Lys	Met	Val	Tyr	Glu 665	Asp	Thr	Leu	Thr	Leu 670	Phe	Pro	
Phe	Ser	Gly 675	Glu	Thr	Val	Phe	Met 680	Ser	Met	Glu	Asn	Pro 685	Gly	Leu	Trp	
Val	Leu 690	Gly	Cys	His	Asn	Ser 695	Asp	Leu	Arg	Asn	Arg 700	Gly	Met	Thr	Ala	
Leu 705	Leu	Lys	Val	Tyr	Ser 710	Cys	Asp	Arg	Asp	Ile 715	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Asp 720	
Asn	Thr	Tyr	Glu	Asp 725	Ile	Pro	Gly	Phe	Leu 730	Leu	Ser	Gly	Lys	Asn 735	Val	
Ile	Glu	Pro	Arg 740	Ser	Phe	Ala	Gln	Asn 745	Ser	Arg	Pro	Pro	Ser 750	Ala	Ser	
Gln	Lys	Gln 755	Phe	Gln	Thr	Ile	Thr 760	Ser	Pro	Glu	Asp	Asp 765	Val	Glu	Leu	
Asp	Pro 770	Gln	Ser	Gly	Glu	Arg 775	Thr	Gln	Ala	Leu	Glu 780	Glu	Leu	Ser	Val	
Pro 785	Ser	Gly	Asp	Gly	Ser 790	Met	Leu	Leu	Gly	Gln 795	Asn	Pro	Ala	Pro	His 800	
Gly	Ser	Ser	Ser	Ser 805	Asp	Leu	Gln	Glu	Ala 810	Arg	Asn	Glu	Ala	Asp 815	Asp	
Tyr	Leu	Pro	Gly 820	Ala	Arg	Glu	Arg	Asn 825	Thr	Ala	Pro	Ser	Ala 830	Ala	Ala	
Arg	Leu	Arg 835	Pro	Glu	Leu	His	His 840	Ser	Ala	Glu	Arg	Val 845	Leu	Thr	Pro	
Glu	Pro 850	Glu	Lys	Glu	Leu	Lys 855	Lys	Leu	Asp	Ser	Lys 860	Met	Ser	Ser	Ser	
Ser 865	Asp	Leu	Leu	Lys	Thr 870	Ser	Pro	Thr	Ile	Pro 875	Ser	Asp	Thr	Leu	Ser 880	
Ala	Glu	Thr	Glu	Arg 885	Thr	His	Ser	Leu	Gly 890	Pro	Pro	His	Pro	Gln 895	Val	

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

1610						1615						1620
Asp	Leu 1625	Glu	Lys	Asp	Val	His 1630	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly 1635	Pro Leu Leu
Ile	Cys 1640	Arg	Ala	Asn	Thr	Leu 1645	Asn	Ala	Ala	His	Gly 1650	Arg Gln Val
Thr	Val 1655	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu 1660	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe 1665	Asp Glu Thr
Lys	Ser 1670	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu 1675	Asn	Val	Glu	Arg	Asn 1680	Cys Arg Ala
Pro	Cys 1685	His	Leu	Gln	Met	Glu 1690	Asp	Pro	Thr	Leu	Lys 1695	Glu Asn Tyr
Arg	Phe 1700	His	Ala	Ile	Asn	Gly 1705	Tyr	Val	Met	Asp	Thr 1710	Leu Pro Gly
Leu	Val 1715	Met	Ala	Gln	Asn	Gln 1720	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr 1725	Leu Leu Ser
Met	Gly 1730	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile 1735	His	Ser	Ile	His	Phe 1740	Ser Gly His
Val	Phe 1745	Ser	Val	Arg	Lys	Lys 1750	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met 1755	Ala Val Tyr
Asn	Leu 1760	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe 1765	Glu	Thr	Val	Glu	Met 1770	Leu Pro Ser
Lys	Val 1775	Gly	Ile	Trp	Arg	Ile 1780	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly 1785	Glu His Leu
Gln	Ala 1790	Gly	Met	Ser	Thr	Thr 1795	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser 1800	Lys Glu Cys
Gln	Ala 1805	Pro	Leu	Gly	Met	Ala 1810	Ser	Gly	Arg	Ile	Arg 1815	Asp Phe Gln
Ile	Thr 1820	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr 1825	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro 1830	Lys Leu Ala
Arg	Leu 1835	His	Tyr	Ser	Gly	Ser 1840	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser 1845	Thr Lys Asp

ES 2 721 478 T3

Pro His Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile
 1850 1855 1860

His Gly Ile Met Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu
 1865 1870 1875

Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Arg Asn
 1880 1885 1890

Trp Gln Ser Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe
 1895 1900 1905

Phe Gly Asn Val Asp Ala Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn
 1910 1915 1920

Pro Pro Ile Val Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr
 1925 1930 1935

Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu
 1940 1945 1950

Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Gln Asn Lys Ala Ile Ser
 1955 1960 1965

Asp Ser Gln Ile Thr Ala Ser Ser His Leu Ser Asn Ile Phe Ala
 1970 1975 1980

Thr Trp Ser Pro Ser Gln Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Thr
 1985 1990 1995

Asn Ala Trp Arg Pro Arg Val Ser Ser Ala Glu Glu Trp Leu Gln
 2000 2005 2010

Val Asp Leu Gln Lys Thr Val Lys Val Thr Gly Ile Thr Thr Gln
 2015 2020 2025

Gly Val Lys Ser Leu Leu Ser Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu
 2030 2035 2040

Val Ser Ser Ser Gln Asp Gly Arg Arg Trp Thr Leu Phe Leu Gln
 2045 2050 2055

Asp Gly His Thr Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Ser Thr
 2060 2065 2070

Pro Val Val Asn Ala Leu Asp Pro Pro Leu Phe Thr Arg Tyr Leu
 2075 2080 2085
 Arg Ile His Pro Thr Ser Trp Ala Gln His Ile Ala Leu Arg Leu
 2090 2095 2100

Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 2105 2110

ES 2 721 478 T3

<210> 8
 <211> 2332
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

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

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 721 478 T3

Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr
 1190 1195 1200
 Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr
 1205 1210 1215
 Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg
 1220 1225 1230
 Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu
 1235 1240 1245
 Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys
 1250 1255 1260
 His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu
 1265 1270 1275
 Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys
 1280 1285 1290
 Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr
 1295 1300 1305
 Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu
 1310 1315 1320
 Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr
 1325 1330 1335
 Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr
 1340 1345 1350
 Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser
 1355 1360 1365
 Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala
 1370 1375 1380
 Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser
 1385 1390 1395
 Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser
 1400 1405 1410
 Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val
 1415 1420 1425

ES 2 721 478 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr
 2135 2140 2145

Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
 2150 2155 2160

Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu
 2165 2170 2175

Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser
 2180 2185 2190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Asp Leu Tyr
 2330

<210> 9
 <211> 2324
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

5

<400> 9

ES 2 721 478 T3

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

Met Gln Ser Asp Leu Leu Ser Ala Leu His Ala Asp Thr Ser Phe Ser
20 25 30

Ser Arg Val Pro Gly Ser Leu Pro Leu Thr Thr Ser Val Thr Tyr Arg
35 40 45

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

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

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

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

Ala Glu Tyr Glu Asp Gln Thr Ser Gln Lys Glu Lys Glu Asp Asp Asn
115 120 125

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

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

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

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

Leu Gln Glu Phe Val Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser
195 200 205

Trp His Ser Glu Thr Asn Ala Ser Leu Thr Gln Ala Glu Ala Gln His
210 215 220

Glu Leu His Thr Ile Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu
225 230 235 240

Thr Val Cys His Lys Arg Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly
245 250 255

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

500					505					510					
Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser
		515					520					525			
Ser	Phe	Ile	Asn	Leu	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro
	530					535					540				
Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Met
545					550					555					560
Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn
				565					570					575	
Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn	Met	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Ala
			580					585					590		
Asp	Val	Val	Gln	Pro	His	Asp	Pro	Glu	Phe	Gln	Leu	Ser	Asn	Ile	Met
		595					600					605			
His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	Phe	Asp	Asn	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys
	610					615					620				
Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ile	Leu	Ser	Val	Gly	Ala	Gln	Thr
625					630					635					640
Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met
				645					650					655	
Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val
			660					665					670		
Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	Gly	Leu	Trp	Val	Leu	Gly	Cys	His	Asn
		675					680					685			
Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser
	690					695					700				
Cys	Asn	Arg	Asn	Ile	Asp	Asp	Tyr	Tyr	Glu	Asp	Thr	Tyr	Glu	Asp	Ile
705					710					715					720
Pro	Thr	Pro	Leu	Leu	Asn	Glu	Asn	Asn	Val	Ile	Lys	Pro	Arg	Ser	Phe
				725					730					735	
Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro	Ser	Thr	Lys	Glu	Lys	Gln	Leu	Lys	Ala
			740					745					750		

ES 2 721 478 T3

Thr Thr Thr Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys Ile Asp Leu Gln Ser Gly
 755 760 765
 Glu Arg Thr Gln Leu Ile Lys Ala Gln Ser Val Ser Ser Asp Leu
 770 775 780
 Leu Met Leu Leu Gly Gln Asn Pro Thr Pro Arg Gly Leu Phe Leu Ser
 785 790 795 800
 Asp Leu Arg Glu Ala Thr Asp Arg Ala Asp Asp His Ser Arg Gly Ala
 805 810 815
 Ile Glu Arg Asn Lys Gly Pro Pro Glu Val Ala Ser Leu Arg Pro Glu
 820 825 830
 Leu Arg His Ser Glu Asp Arg Glu Phe Thr Pro Glu Pro Glu Leu Gln
 835 840 845
 Leu Arg Leu Asn Glu Asn Leu Gly Thr Asn Thr Thr Val Glu Leu Lys
 850 855 860
 Lys Leu Asp Leu Lys Ile Ser Ser Ser Ser Asp Ser Leu Met Thr Ser
 865 870 875 880
 Pro Thr Ile Pro Ser Asp Lys Leu Ala Ala Ala Thr Glu Lys Thr Gly
 885 890 895
 Ser Leu Gly Pro Pro Asn Met Ser Val His Phe Asn Ser His Leu Gly
 900 905 910
 Thr Ile Val Phe Gly Asn Asn Ser Ser His Leu Ile Gln Ser Gly Val
 915 920 925
 Pro Leu Glu Leu Ser Glu Glu Asp Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ala
 930 935 940
 Pro Leu Met Asn Ile Gln Glu Ser Ser Leu Arg Glu Asn Val Leu Ser
 945 950 955 960
 Met Glu Ser Asn Arg Leu Phe Lys Glu Glu Arg Ile Arg Gly Pro Ala
 965 970 975
 Ser Leu Ile Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys Val Asn Ile Ser Ser Val
 980 985 990
 Lys Thr Asn Arg Ala Pro Val Asn Leu Thr Thr Asn Arg Lys Thr Arg
 995 1000 1005

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

Ser Glu Gly Ile His Met Ala Asn Phe Ser Lys Ile Arg Glu Glu
1250 1255 1260

Ala Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Asn Gln Met Val Glu
1265 1270 1275

Arg Phe Pro Ser Thr Thr Arg Met Ser Ser Asn Ala Ser Gln His
1280 1285 1290

Val Ile Thr Gln Arg Gly Lys Arg Ser Leu Lys Gln Pro Arg Leu
1295 1300 1305

Ser Gln Gly Glu Ile Lys Phe Glu Arg Lys Val Ile Ala Asn Asp
1310 1315 1320

Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn Met Asn Tyr Leu Ala Gln Gly
1325 1330 1335

Thr Leu Thr Gln Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Arg Ala Ile
1340 1345 1350

Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Ser Met Arg Asn His Val Thr
1355 1360 1365

Ile Gln Met Asn Asp Ser Ala Leu Pro Val Ala Lys Glu Ser Ala
1370 1375 1380

Ser Pro Ser Val Arg His Thr Asp Leu Thr Lys Ile Pro Ser Gln
1385 1390 1395

His Asn Ser Ser His Leu Pro Ala Ser Ala Cys Asn Tyr Thr Phe
1400 1405 1410

Arg Glu Arg Thr Ser Gly Val Gln Glu Gly Ser His Phe Leu Gln
1415 1420 1425

Glu Ala Lys Arg Asn Asn Leu Ser Leu Ala Phe Val Thr Leu Gly
1430 1435 1440

Ile Thr Glu Gly Gln Gly Lys Phe Ser Ser Leu Gly Lys Ser Ala
1445 1450 1455

Thr Asn Gln Pro Met Tyr Lys Lys Leu Glu Asn Thr Val Leu Leu
1460 1465 1470

Gln Pro Gly Leu Ser Glu Thr Ser Asp Lys Val Glu Leu Leu Ser

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

Ala Gln Ser Gly Asp Val Gln Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln
 1715 1720 1725

Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu
 1730 1735 1740

Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu
 1745 1750 1755

Val Glu Asp Asn Ile Val Val Thr Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg
 1760 1765 1770

Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Asp Glu Asp Glu
 1775 1780 1785

Gly Gln Gly Ala Glu Pro Arg Arg Lys Phe Val Asn Pro Asn Glu
 1790 1795 1800

Thr Lys Ile Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr
 1805 1810 1815

Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val
 1820 1825 1830

Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu
 1835 1840 1845

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

Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Val Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr
 1865 1870 1875

Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Leu Glu Arg Asn Cys Arg Ala
 1880 1885 1890

Pro Cys Asn Val Gln Lys Glu Asp Pro Thr Leu Lys Glu Asn Phe
 1895 1900 1905

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

Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Lys Val Arg Trp Tyr Leu Leu Ser
 1925 1930 1935

Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His
 1940 1945 1950

ES 2 721 478 T3

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

ES 2 721 478 T3

Thr Trp Ser Pro Ser Gln Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Thr
 2195 2200 2205

Asn Ala Trp Arg Pro Gln Ala Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln
 2210 2215 2220

Val Asp Phe Arg Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Ile Thr Thr Gln
 2225 2230 2235

Gly Val Lys Ser Leu Leu Ile Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu
 2240 2245 2250

Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Asn Trp Thr Leu Phe Leu Gln
 2255 2260 2265

Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Arg Asp Ser Ser Thr
 2270 2275 2280

Pro Val Arg Asn Arg Leu Glu Pro Pro Leu Val Ala Arg Tyr Val
 2285 2290 2295

Arg Leu His Pro Gln Ser Trp Ala His His Ile Ala Leu Arg Leu
 2300 2305 2310

Glu Val Leu Gly Cys Asp Thr Gln Gln Pro Ala
 2315 2320

5 <210> 10
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

<400> 10

Asp Ile Gly Asp Tyr Tyr Asp Asn Thr Tyr Glu Asp Ile Pro Gly Phe
 1 5 10 15

10 Leu Leu Ser Gly Lys Asn Val Ile Glu Pro Arg
 20 25

15 <210> 11
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr
 1 5 10 15

20 Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg
 20 25

25 <210> 12
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 12

ES 2 721 478 T3

Asn Ile Asp Asp Tyr Tyr Glu Asp Thr Tyr Glu Asp Ile Pro Thr Pro
1 5 10 15

Leu Leu Asn Glu Asn Asn Val Ile Lys Pro Arg
20 25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante del factor VIII (FVIII) aislada y recombinante, con el dominio B total o parcialmente deletado, comprendiendo la variante de FVIII una secuencia que es al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO. 1; y estando desprovista de una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 716 a 742 del factor VIII porcino tal como se representa en la figura 2 o los aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7.
- 10 2. Variante de FVIII según la reivindicación 1, que comprende una secuencia que es al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 %, al menos el 99,6 %, al menos el 99,7 %, al menos el 99,8 % o al menos el 99,9 % idéntica a SEQ ID NO: 1, estando desprovista la variante de la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 716 a 742 del factor VIII porcino tal como se representa en la figura 2 o los aminoácidos 714 a 740 de SEQ ID NO: 7.
- 15 3. Variante de FVIII según la reivindicación 2, en la que dicha variante es SEQ ID NO: 1.
4. Variante de FVIII según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la variante de FVIII tiene el dominio B parcialmente deletado y la porción restante del dominio B es SEQ ID NO: 4.
- 20 5. Polinucleótido que codifica un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Vector de expresión que comprende un polinucleótido según la reivindicación 5.
7. Célula de mamífero que comprende un vector de expresión según la reivindicación 6.
- 25 8. Método para producir una variante de FVIII, que comprende las etapas de:
 - a. cultivar una célula de mamífero según la reivindicación 7;
 - 30 b. aislar de la célula de mamífero la variante de FVIII; y, opcionalmente,
 - c. formular la variante del factor VIII junto con excipientes apropiados para dar una composición farmacéutica.
- 35 9. Composición farmacéutica que comprende una variante del factor VIII según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
10. Variante de FVIII según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en medicina.
- 40 11. Variante de FVIII según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de hemofilia.
12. Variante de FVIII para su uso según la reivindicación 11, en la que la hemofilia es hemofilia A o hemofilia adquirida, en la que la hemofilia se trata opcionalmente en pacientes que han desarrollado anticuerpos contra FVIII humano.
- 45 13. Variante de FVIII para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que la variante del factor VIII se administra en una cantidad de no más de 200 µg/dosis o 150 µg/dosis o 140 µg/dosis.

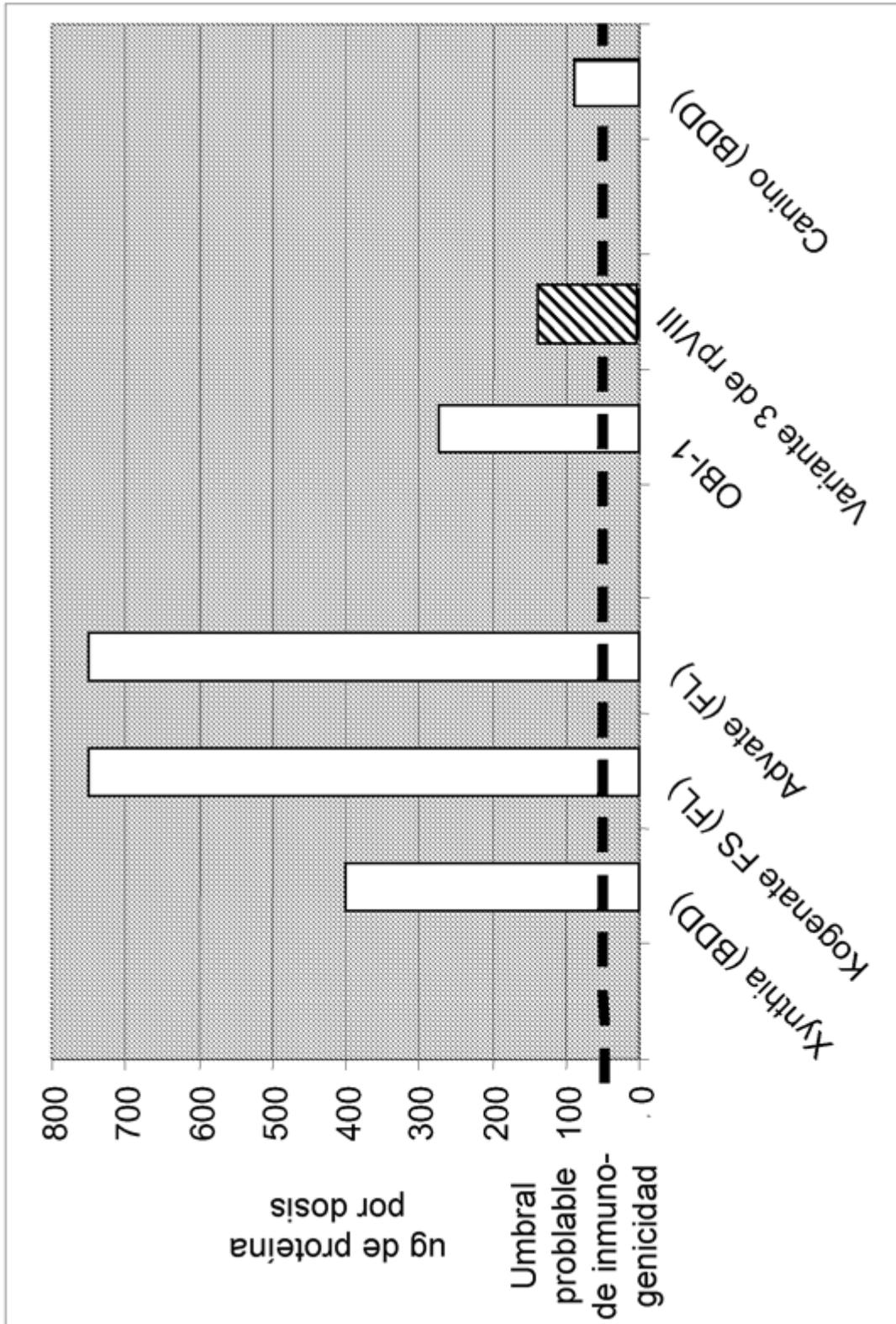


Fig. 1

ES 2 721 478 T3

	1				50
HUMFVIII	ATTRYYLGAV	ELSWDYMQSD	.LGELPVDAR	FPPRVPKSFP	FNTSVVYKKT
PIGFVIII	AIRRYYLGA	ELSWDYRQSE	LLRELHVDTR	FPATAPGALP	LGPSVLYKKT
MURFVIII	AIRRYYLGA	ELSWNYIQSD	LLSVLIITDSR	FLPRMSTSPF	FNTSIMYKKT
CANFVIII	ATRKYYLGAV	ELSWDYMQSD	LLSALHADTS	FSSRVPGSLP	LTTSVTYRKT
	51				100
HUMFVIII	LFVEFTDHLF	NIAKPRPPWM	GLLGPTIQAE	VYDTVVITLK	NMASHPVS LH
PIGFVIII	VFVEFTDQLF	SVARPRPPWM	GLLGPTIQAE	VYDTVVVTLK	NMASHPVS LH
MURFVIII	VFVEYKQQLF	NIAKPRPPWM	GLLGPTIWF	VHDTVVITLK	NMASHPVS LH
CANFVIII	VFVEFTDDL	NIAKPRPPWM	GLLGPTIQAE	VYDTVVIVLK	NMASHPVS LH
	101				150
HUMFVIII	AVGVSYWKA	EGAEDDQTS	QREKEDDKVF	PGGSHTYVWQ	VLKENGPMAS
PIGFVIII	AVGVSEWKS	EGAEDDQTS	QREKEDDKVL	PGKSQTYVWQ	VLKENGPMAS
MURFVIII	AVGVSYWKA	EGDEYEDQTS	QMEKEDDKVF	PGESHTYVWQ	VLKENGPMAS
CANFVIII	AVGVSYWKA	EGAEDDQTS	QKEKEDDNI	PGESHTYVWQ	VLKENGPMAS
	151				200
HUMFVIII	DPLCLTYSYL	SHVDLVKDLN	SGLIGALLVC	REGSLAKEKT	QTLHKFILLF
PIGFVIII	DPPCLTYSYL	SHVDLVKDLN	SGLIGALLVC	REGSLTRERT	QNLIEFVLLF
MURFVIII	DPPCLTYSYM	SHVDLVKDLN	SGLIGALLVC	KEGSLSKERT	QMLYQFVLLF
CANFVIII	DPPCLTYSYF	SHVDLVKDLN	SGLIGALLVC	KEGSLAKERT	QTLQEFVLLF
	201				250
HUMFVIII	AVFDEGKSWH	SETKNSLMQD	RDAASARAWP	KMHTVNGYVN	RSLPGLIGCH
PIGFVIII	AVFDEGKSWH	SARNDSWTRA	MDPAPARAQP	AMHTVNGYVN	RSLPGLIGCH
MURFVIII	AVFDEGKSWH	SETNDSYTQS	MDSASARDWP	KMHTVNGYVN	RSLPGLIGCH
CANFVIII	AVFDEGKSWH	SETNASLTQ.AEAQH	ELHTINGYVN	RSLPGLTVCH
	251				300
HUMFVIII	RKSVMYWHVIG	MGTTPPEVHSI	FLEGHTFLVR	NHRQASLEIS	PITFLTAQTL
PIGFVIII	KKSVMYWHVIG	MGTSPPEVHSI	FLEGHTFLVR	HHRQASLEIS	PLTFLTAQTF
MURFVIII	RKSVMYWHVIG	MGTTPPEIHSI	FLEGHTFFVR	NHRQASLEIS	PITFLTAQTL
CANFVIII	KRSVMYWHVIG	MGTTPPEVHSI	FLEGHTFLVR	NHRQASLEIS	PITFLTAQTF
	301				350
HUMFVIII	LMDLGQFLLF	CHISSHQHDG	MEAYVKVDSC	PEEPQLRMK.	NNEEAEDYDD
PIGFVIII	LMDLGQFLLF	CHISSHHGG	MEAHVRVESC	AEEPQLRRK.	ADEE.EDYDD
MURFVIII	LIDLQGFLLF	CHISSHKHDG	MEAYVKVDSC	PEESQWQKKN	NNEEMEDYDD
CANFVIII	LMDLGQFLLF	CHIPSHQHDG	MEAYVKVDSC	PEEPQLRMK.	NNED.KDYDD
	351				400
HUMFVIII	DLTDSEMDVV	RFDDDNSPSF	IQIRSVAKKH	PKTWVHYIAA	EEEDWDYAPL
PIGFVIII	NLYDSDMDVV	RLDGDDVSPF	IQIRSVAKKH	PKTWVHYISA	EEEDWDYAPA
MURFVIII	DLY.SEMDMF	TLDY.SSPF	IQIRSVAKKY	PKTWIHYISA	EEEDWDYAPS
CANFVIII	GLYDSDMDVV	SFDDSSSPF	IQIRSVAKKH	PKTWVHYIAA	EEEDWDYAPS
	401				450
HUMFVIII	VLAPDDRSYK	SQYLNNGPQR	IGRKYKKVRF	MAYTDETFKT	REAIQHESGI
PIGFVIII	VPSPDRSYK	SLYLNSGPQR	IGRKYKKARF	VAYTDVTFKT	RKAIPYESGI
MURFVIII	VPTSDNGSYK	SQYLSNGPHR	IGRKYKKVRF	IAYTDETFKT	RETIQHESGL
CANFVIII	GTPPNDRSHK	NLYLNNGPQR	IGKYYKKVRF	VAYTDETFKT	REAIQYESGI
	451				500
HUMFVIII	LGPLLYGEVG	DTLLIIFKNQ	ASRPYNIYPH	GITDVRPLYS	RRLPKGVKHL
PIGFVIII	LGPLLYGEVG	DTLLIIFKNK	ASRPYNIYPH	GITDVSALHP	GRLKLGWKHL
MURFVIII	LGPLLYGEVG	DTLLIIFKNQ	ASRPYNIYPH	GITDVSPHHA	RRLPRGIKHV
CANFVIII	LGPLLYGEVG	DTLLIIFKNQ	ASRPYNIYPH	GINYVTPLHT	GRLPKGVKHL
	501				550

Fig. 2a

ES 2 721 478 T3

HUMFVIII	KDFPILPGEI	FKYKWTVTVE	DGPTKSDPRC	LTRYYSFVN	MERDLASGLI
PIGFVIII	KDMPILPGET	FKYKWTVTVE	DGPTKSDPRC	LTRYYS SIN	LEKDLASGLI
MURFVIII	KDLPIHPGEI	FKYKWTVTVE	DGPTKSDPRC	LTRYYSFIN	PERDLASGLI
CANFVIII	KDMPILPGEI	FKYKWTVTVE	DGPTKSDPRC	LTRYYSFIN	LERDLASGLI
	551				600
HUMFVIII	GPLLCYKES	VDQRGNQIMS	DKRNVILFSV	FDENRSWYLT	ENIQRFLPNP
PIGFVIII	GPLLCYKES	VDQRGNQMMS	DKRNVILFSV	FDENQSWYLA	ENIQRFLPNP
MURFVIII	GPLLCYKES	VDQRGNQMMS	DKRNVILFSI	FDENQSWYIT	ENMQRFLPNA
CANFVIII	GPLLCYKES	VDQRGNQMMS	DKRNVILFSV	FDENRSWYLT	ENMQRFLPNA
	601				650
HUMFVIII	AGVQLEDPEF	QASNIMHSIN	GYVFDSLQLS	VCLHEVAYWY	ILS1GAQTDF
PIGFVIII	DGLQPQDPEF	QASNIMHSIN	GYVFDSLQLS	VCLHEVAYWY	ILSVGAQTDF
MURFVIII	AKTQPQDPGF	QASNIMHSIN	GYVFDSELEL	VCLHEVAYWH	ILSVGAQTDF
CANFVIII	DVVQPHDPEF	QLSNIMHSIN	GYVFDNLQLS	VCLHEVAYWY	ILSVGAQTDF
	651				700
HUMFVIII	LSVFFSGYTF	KHKMVEYEDTL	TLFPFSGETV	FMSMENPGLW	ILGCHNSDFR
PIGFVIII	LSVFFSGYTF	KHKMVEYEDTL	TLFPFSGETV	FMSMENPGLW	VLGCHNSDLR
MURFVIII	LSIFFSGYTF	KHKMVEYEDTL	TLFPFSGETV	FMSMENPGLW	VLGCHNSDFR
CANFVIII	LSVFFSGYTF	KHKMVEYEDTL	TLFPFSGETV	FMSMENPGLW	VLGCHNSDFR
	701				750
HUMFVIII	NRGMTALLKV	SSCDK	<u>NTGDY YEDSYEDISA YLLSKNNAIE PR</u>	<u>SEFSONSRH</u>	
PIGFVIII	NRGMTALLKV	YSCDR	<u>DIGDY YDNTYEDIPG FLLSGKNVIE PR</u>	<u>SEFAONSRE</u>	
MURFVIII	KRGMTALLKV	SSCDK	<u>STSDY YEEIYEDIPT QLVNENNVID PR</u>	<u>SEFFONTNH</u>	
CANFVIII	NRGMTALLKV	SSCNR	<u>NIDDY YEDTYEDIPT PLLNENNVIK PR</u>	<u>SEFSONSRH</u>	
	751				800
HUMFVIII	<u>ESTRQKQFNA</u>	TTIPENDIEK	TDPWFHARTP	MPKIQNVSSS	DLLMLLRQS.
PIGFVIII	<u>ESTRQKQFQT</u>	ITSPEDDVE.	LDPQSGERTQ	ALEELSVPSG	DGSMLLGQN.
MURFVIII	<u>ESTRKKKFKD</u>	STIPKNDMEK	IEPQFEEIAE	MLKVQSVSVS	DMMLLLGQSH
CANFVIII	<u>ESTREKQLKA</u>	TTTPENDIEK	IDLQSGERTQ	LIIKAQSVSSS	DLLMLLGQN.
	801				850
HUMFVIII	<u>PTPHGLSLSD</u>	LQEAKYETFS	DDPSGGAIDS	NNSLSEMTHF	RPQLHHSGDM
PIGFVIII	<u>PAPHGSSSSD</u>	LQEARNE..A	DDYLPGARER	NTAPSAAARL	RPELHHSAR
MURFVIII	<u>PTPHGLFLSD</u>	GOEAIYEAIH	DDHSPNAIDS	NEGPSKVTQL	RPESHSEKI
CANFVIII	<u>PTPRGLFLSD</u>	LREA..TDRA	DDHSRGAIER	NKGPPEVASL	RPELRHSEDR
	851				900
HUMFVIII	<u>VFTPESGLQL</u>	RLNEKLGTTA	ATELKKLDFK	VSSTSNNLI.	.STIPSDNLA
PIGFVIII	<u>VLTPEPE...</u>KELKKLDSK	MSSSSDLLKT	SPTIPSDTLS
MURFVIII	<u>VFTPQGLQL</u>	RSNKSLETTI	EVKWKGLGLQ	VSSLPSNLMT	.TTILSDNLK
CANFVIII	<u>EFTPEPELQL</u>	RLNENLGTNT	TVELKKLDLK	ISSSSDSLMT	SPTIPSDKLA
	901				950
HUMFVIII	<u>AGTDNTSSLG</u>	PPSMPVHYDS	QLDTTLFGKK	SSPLTESGGP	LSLSEENNDS
PIGFVIII	<u>AETERHSLG</u>	PPHPQVNFRS	QLGAIVLGKN	SSHFIGAGVP	LGSTEED...
MURFVIII	<u>ATFEKTDSSG</u>	FPDMPVHSSS	KLSTTAFGKK	AYSLVGSHVP	LNASEENSDS
CANFVIII	<u>AATEKTGSLG</u>	PPNMSVHFNS	HLGTIVFGNN	SSHLIQSGVP	LELSEEDNDS
	951				1000
HUMFVIII	<u>KLLEGLMNS</u>	QESSWGKNVS	STESGRLFKG	KRAHGPALLT	KDNALFKVSI
PIGFVIII	<u>.....</u>	HESSLGENVS	PVESDGIFEK	ERAHGPASLT	KDDVLFKVNI
MURFVIII	<u>NILDSTLMYS</u>	QESLPRDNIL	SIENDRLRE	KRFHGIALLT	KDNTLFKDNV
CANFVIII	<u>KLLEAPLMNI</u>	QESSLRENVL	SMESNRLFKE	ERIRGPASLI	KDNALFKVNI

Fig. 2b

ES 2 721 478 T3

	1001		1050
HUMFVIII	<u>SLLKTNKTSN NSATNRKTHI DGPSLLIENS PSVWQNI.LE SDTEFKKVTP</u>		
PIGFVIII	<u>SLVKTNKARV YLKTNRKIHI DDAALLTENR ASA.....</u>		
MURFVIII	<u>SLMKTNKTYN HSTTNEKLHT ESPT.SIENS TTDLQDAILK VNSEIQEVTA</u>		
CANFVIII	<u>SSVKTNRAPV NLTTRKTRV AIPTLLIENS TSVWQDIMLE RNTEFKEVTS</u>		
	1051		1100
HUMFVIII	<u>LIHDRMLMDK NATALRLNHM SNKTTSSKNM EMVQOKKEGP IPPDAQNPDM</u>		
PIGFVIII	<u>.....TFMDK NTTASGLNHV SN.....</u>		
MURFVIII	<u>LIHDGTLGK NSTYLRLNHM LNRTTSTKNK DIFHRKDEDP IPQDEENTIM</u>		
CANFVIII	<u>LIHNETFMDR NTTALGLNHV SNKTTLSKNV EMAHQKEDP VPLRAENPDL</u>		
	1101		1150
HUMFVIII	<u>SFFKMLFLPE SARWIQORTHG KNSLNSGQGP SPKQLVSLGP EKSVEGQNFL</u>		
PIGFVIII	<u>.....WIKGPLG KNPLSSSERGP SPELLTSSGS GKSVKQGSSG</u>		
MURFVIII	<u>PFSKMLFLSE SSNWFKKTNG NNSLNSEQEH SPKQLVYLMF KKYVKNQSFL</u>		
CANFVIII	<u>SSSKIPFLPD WI....KTHG KNSLSSEQRP SPKQLTSLGS EKSVKDQNFL</u>		
	1151		1200
HUMFVIII	<u>SEKNKVVVGK GEFTKDVGLK EMVFPSSRNL FLTNLDNLHE NNTHNQEKKI</u>		
PIGFVIII	<u>QGRIRVAVEE EELSKG...K EMMLPNSLT FLTNSADVQG NDTHSQGKKS</u>		
MURFVIII	<u>SEKNKVTVEQ DGFTKNIGLK DMAFPHNMSI FLTTLSNVHE NGRHNEKNI</u>		
CANFVIII	<u>SE.EKVVVGE DEFTKDETELQ E.IFPNNSI FFANLANVQE NDTYNQEKKS</u>		
	1201		1250
HUMFVIII	<u>QEEIEKKETL IQENVVLPQI HTVTGTKNFM KNLFLLSTRQ NVEGSYDGY</u>		
PIGFVIII	<u>REEMERREKL VQEKVDLPQV YTATGTKNFL RNIFHQSTEP SVEGFDGGSH</u>		
MURFVIII	<u>QEEIE.KEAL IEEKVVLQV HEATGSKNFL KDILILGTRQ NISLYE..VH</u>		
CANFVIII	<u>PEEIERKEKL TQENVALPQA HTMIGTKNFL KNLFLLSTKQ NVAGLEEQPY</u>		
	1251		1300
HUMFVIII	<u>APVLQDFRSL NDSTNRKTH TAHSKKG.. EENLEGLGN QTKQIVEKYA</u>		
PIGFVIII	<u>APVPQDSRSL NDSAERAETH IAHSAIR.. EEAPLEAPGN RT.....</u>		
MURFVIII	<u>VPVLQNTSI NNSTNTVQIH MEHFPKRRKD KETNSEGLVN KTREMVKNY.</u>		
CANFVIII	<u>TPILQDTRSL NDSPHSEGIH MANFSKIR.. EENLEGLGN QTNQMVERFP</u>		
	1301		1350
HUMFVIII	<u>CTTRISPNTS QQNFVTQRSK RALKQFRLPL EETELEKRRI VDDTSTQWSK</u>		
PIGFVIII	<u>.....GPG PRSAVPRVK QSLKQIRLPL EEIKPERGVV LNATSTRWS.</u>		
MURFVIII	<u>.....PS QKNITTQRSK RALGQFRL..STQWLK</u>		
CANFVIII	<u>STTRMSSNAS QH.VITQRGK RSLKQPRLSQ GEIKFERKVI ANDTSTQWSK</u>		
	1351		1400
HUMFVIII	<u>NMKHLTPSTL TQIDYNEKEK GAITQSPLSD CLTRSHSIPQ ANRSPLPIAK</u>		
PIGFVIII	<u>.....</u>		
MURFVIII	<u>TINCSTQCI KQIDHSKEMK KFTKSSLS SSVIK.STTQ TNSSDSHIVK</u>		
CANFVIII	<u>NMNYLAQGT TQIEYNEKEK RAITQSPLSD CSMRNHVTIQ MNDSALPVAK</u>		
	1401		1450
HUMFVIII	<u>VSSFPSIRPI YLTRVLFQDN SSSLPAAS.. ..YRKKDSGV QESSHFLQGA</u>		
PIGFVIII	<u>.....ESSPILQGA</u>		
MURFVIII	<u>TSAFP...PI DLKRSPFQNK FSHVQASSYI YDFKTKSSRI QESNNFLKET</u>		
CANFVIII	<u>ESASPSVRHT DLTKIPSQHN SSSLPASACN YTFRERTSGV QEGSHFLQEA</u>		
	1451		1500
HUMFVIII	<u>KKNLNLAIL TLEMTGDQRE VGSLGTSATN SVTYKKVENT VLPKPLPKT</u>		
PIGFVIII	<u>KRNLSLPFL TLEMAGGQK ISALGKSAAG PLASGKLEKA VLSSAGLSEA</u>		
MURFVIII	<u>KINNPALAIL PWNMFIDQK FTSPGKSNTN SVTYKKRENI IFLKPTLPEE</u>		
CANFVIII	<u>KRNLSLAFV TLGITEGQK FSSLGKSATN QPMYKKLENT VLLQPLSET</u>		
	1501		1550

Fig. 2c

ES 2 721 478 T3

HUMFV8III	SGKVELLPKV	HIYQKDLFPT	ETSNVSPGHL	DLVEGSLLOQ	TEGAIKWNEA
PIGFV8III	SGKAEFLPKV	RVHREDLLPQ	KTSNVSCAHG	DLGQEIFLQK	TRGPVNLNKV
MURFV8III	SGKIELLPQV	SIQEEEILPT	ETSHGSPGHL	NLMKEVFLOK	IQGPTKWNKA
CANFV8III	SDKVELLSQV	HVDQEDSFPT	KTSNDSPGHL	DLMGKIFLOK	TQGPVKMNKT
	1551				1600
HUMFV8III	NRPGKVPFLR	VATESSAKT?	SKLLDPLAWD	NHYGTQIPKE	EWKSQEKSPK
PIGFV8III	NRPG.....RT?	SKLLGPPM..PK	EWESLEKSEK
MURFV8III	KRHGES..IK	GKTESSKNTR	SKLLNHAWD	YHYAAQIPKD	MWKSKEKSPE
CANFV8III	NSPGKVPFLK	WATESSEKI?	SKLLGVLAWD	NHYDTQIPSE	EWKSQKKSQT
	1601				1650
HUMFV8III	KTAFKKKDTI	.LSLNACESN	HAIAAINEGQ	NKPEIEVTWA	KQGRTERLC
PIGFV8III	STALRTKDII	SLPLDRHESN	HSIAAKNEGQ	AETQREAAWT	KQGGPGRLC
MURFV8III	IISIKQEDTI	.LSLRPHGNS	HSIGA.NEQ	NWPQRETTWV	KQGQTQRTC
CANFV8III	NTAFKRKDTI	.LPLGPCENN	DSTAINEGQ	DKPQREAMWA	KQGEPRGRC
	1651				1700
HUMFV8III	QNEFVLRKHO	REITRRTLQ	DQEEIDYDDT	ISVEMKKEDF	DIYDEDENQS
PIGFV8III	QNEFVLRKHO	REISLPTFQ?	EEDKMDYDDI	FSTETKGEDF	DIYGEDENQD
MURFV8III	QNEFVLRKHO	RELS..AFQS	EQEATDYDDA	ITITETI.EDF	DIYSEDIKQG
CANFV8III	QNEFVSKHHO	REITVTTLQ?	EEDKFEYDDT	FSIEMKREDF	DIYGDYENQG
	1701				1750
HUMFV8III	PRSFQKKTRH	YFIAAVERLW	DYGMSSSPHV	LRNRAQSGSV	PQFKKVVVFQE
PIGFV8III	PRSFQKRTRH	YFIAAVEQLW	DYGMSESPRA	LRNRAQNGEV	PRFKKVVVFRE
MURFV8III	PRSFQQKTRH	YFIAAVERLW	DYGMSTS.IIV	LRNRVQSDNV	PQFKKVVVFQE
CANFV8III	LRSFQKKTRH	YFIAAVERLW	DYGMSRSPHI	LRNRAQSGDV	QQFKKVVVFQE
	1751				1800
HUMFV8III	FTDGSFTQPL	YRGELNEHLG	LLGPYIRAEV	EDNIMVTFRN	QASRPYSFYS
PIGFV8III	FADGSFTQPS	YRGELNKHLG	LLGPYIRAEV	EDNIMVTFRN	QASRPYSFYS
MURFV8III	FTDGSFSQPL	YRGELNEHLG	LLGPYIRAEV	EDNIMVTFRN	QASRPYSFYS
CANFV8III	FTDGSFTQPL	YRGELNEHLG	LLGPYIRAEV	EDNIVVTFRN	QASRPYSFYS
	1801				1850
HUMFV8III	SLISYEEDQR	QGAEPKRFV	KPNETKTYFW	KVQHMAPTK	DEFDCKAWAY
PIGFV8III	SLISYPDDQE	QGAEPKRFV	QPNETRKYFW	KVQHMAPTE	DEFDCKAWAY
MURFV8III	SLISYKEDQ.	RGEPRRFV	KPNETKIYFW	KVQHMAPTE	DEFDCKAWAY
CANFV8III	SLISYDEDEG	QGAEPKRFV	NPNETKIYFW	KVQHMAPTK	DEFDCKAWAY
	1851				1900
HUMFV8III	FSDVDLEKDV	HSGLIGPLLV	CHTNTLNPAH	GRQVTVQEFA	LLFTTIFDETK
PIGFV8III	FSDVDLEKDV	HSGLIGPLLI	CRANTLNAAH	GRQVTVQEFA	LLFTTIFDETK
MURFV8III	FSDVDLERDM	HSGLIGPLLI	CHANTLNPAH	GRQVSVQEFA	LLFTTIFDETK
CANFV8III	FSDVDLEKDV	HSGLIGPLLI	CRSNTLNPAH	GRQVTVQEFA	LVFTTIFDETK
	1901				1950
HUMFV8III	SWYFTENMER	NCRAPCNIQM	EDPTFKENYR	FHAINGYIMD	TLPGLVMAQD
PIGFV8III	SWYFTENVER	NCRAPCHLQM	EDPTLKENYR	FHAINGYVMD	TLPGLVMAQN
MURFV8III	SWYFTENVKR	NCKTPCNFQM	EDPTLKENYR	FHAINGYVMD	TLPGLVMAQD
CANFV8III	SWYFTENLER	NCRAPCNVQK	EDPTLKENFR	FHAINGYVKD	TLPGLVMAQD
	1951				2000
HUMFV8III	QRIRWYLLSM	GSNENIHSIH	FSGHVFTVRK	KEEYKMALYN	LYPGVFETVE
PIGFV8III	QRIRWYLLSM	GSNENIHSIH	FSGHVFSVRK	KEEYKMAVYN	LYPGVFETVE
MURFV8III	QRIRWYLLSM	GNNENIQSIH	FSGHVFTVRK	KEEYKMAVYN	LYPGVFETLE
CANFV8III	QKVRWYLLSM	GSNENIHSIH	FSGHVFTVRK	KEEYKMAVYN	LYPGVFETVE
	2001				2050
HUMFV8III	MLPSKAGIWR	VECLIGEHLH	AGMSTLFLVY	SNKCQTPLGM	ASGHIRDFQI

Fig. 2d

ES 2 721 478 T3

PIGFVIII	MLPSKVGIWR	IECLIGEHLQ	AGMSTTFLVY	SKECQAPLGM	ASGRIRDFQI
MURFVIII	MIPSRAGIWR	VECLIGEHLQ	AGMSTLFLVY	SKQCQIPLGM	ASGSIRDFQI
CANFVIII	MLPSQVGIWR	IECLIGEHLQ	AGMSTLFLVY	SKKCQTPLGM	ASGHIRDFQI
	2051				2100
HUMFVIII	TASGQYGQWA	PKLARLHYSG	SINAWSTKEP	FSWIKVDLLA	PMIIHGIKTQ
PIGFVIII	TASGQYGQWA	PKLARLHYSG	SINAWSTKDP	HSWIKVDLLA	PMIIHGIMTQ
MURFVIII	TASGHYGQWA	PNLARLHYSG	SINAWSTKEP	FSWIKVDLLA	PMIVHGIKTQ
CANFVIII	TASGQYGQWA	PKLARLHYSG	SINAWSTKDP	FSWIKVDLLA	PMIIHGIMTQ
	2101				2150
HUMFVIII	GARQKFSSLY	ISQFIIMYSL	DGKKWQTYRG	NSTGTLMVFF	GNVDSSGIKH
PIGFVIII	GARQKFSSLY	ISQFIIMYSL	DGRNWQSYRG	NSTGTLMVFF	GNVDASGIKH
MURFVIII	GARQKFSSLY	ISQFIIMYSL	DGKKWLSYQG	NSTGTLMVFF	GNVDSSGIKH
CANFVIII	GARQKFSSLY	VSQFIIMYSL	DGNKWSYRG	NSTGTLMVFF	GNVDSSGIKH
	2151				2200
HUMFVIII	NIFNPPIIAR	YIRLHPHYS	IRSTLRMELM	GCDLNCSMP	LGMESKAISD
PIGFVIII	NIFNPPIVAR	YIRLHPHYS	IRSTLRMELM	GCDLNCSMP	LGMQNKAISD
MURFVIII	NSFNPPIIAR	YIRLHPHSS	IRSTLRMELM	GCDLNCSIP	LGMESKVISD
CANFVIII	NIFNPPIIAQ	YIRLHPHYS	IRSTLRMELL	GCDFNCSMP	LGMESKAISD
	2201				2250
HUMFVIII	AQITASSYFT	NMFATWSPSK	ARLHLQGRSN	AWRPQVNNPK	EWLQVDFQKT
PIGFVIII	SQITASSHLS	NIFATWSPSQ	ARLHLQGRTN	AWRPRVSSAE	EWLQVDLQKT
MURFVIII	TQITASSYFT	NMFATWSPSQ	ARLHLQGRTN	AWRPQVNDPK	QWLQVDLQKT
CANFVIII	AQITASSYLS	SMLATWSPSQ	ARLHLQGRTN	AWRPQANNPK	EWLQVDFRKT
	2251				2300
HUMFVIII	MKVTGVTTQG	VKSLLTSMYV	KEFLISSSQD	GHQWTLFFQN	GKVKVFQGNQ
PIGFVIII	VKVTGITTQG	VKSLLSSMYV	KEFLVSSSQD	GRRWTLFLQD	GHTKVFQGNQ
MURFVIII	MKVTGIITQG	VKSFLTSMFV	KEFLISSSQD	GHHWTQILYN	GKVKVFQGNQ
CANFVIII	MKVTGITTQG	VKSLLISMYV	KEFLISSSQD	GHNWTLFLQN	GKVKVFQGNR
	2301				2345
HUMFVIII	DSFTPVVNSL	DPPLLTRYLR	IHPQSWVHQI	ALRMEVLGCE	AQDLY
PIGFVIII	DSSTPVVNAL	DPPLFTRYLR	IHPTSWAQHI	ALRLEVLGCE	AQDLY
MURFVIII	DSSTPMMNSL	DPPLLTRYLR	IHPQIWEHQI	ALRLEILGCE	AQQQY
CANFVIII	DSSTPVRNRL	EPPLVARYVR	LHPQSWAHHI	ALRLEVLGCD	TQQPA

Fig. 2e

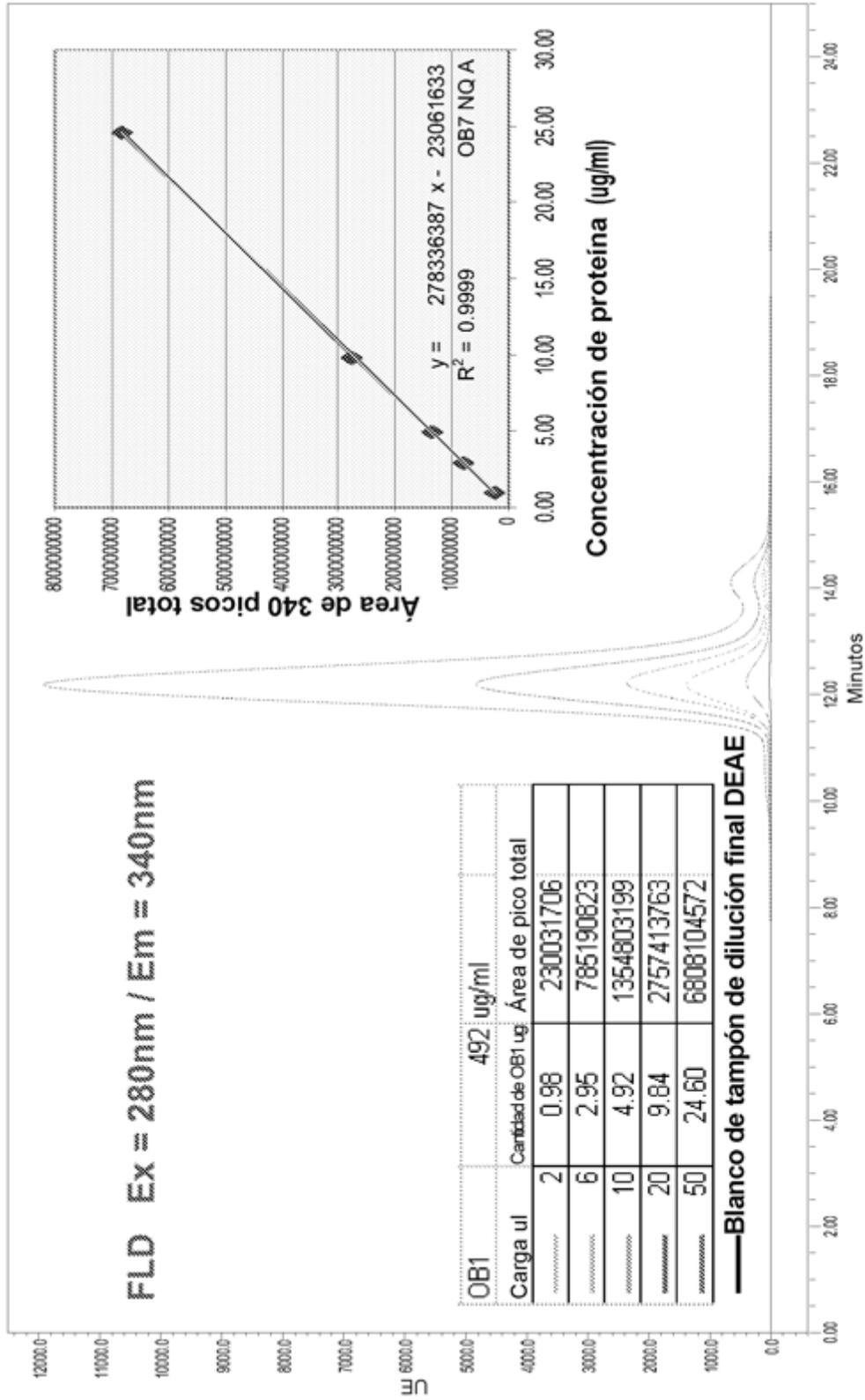


Fig. 3