

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 426**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2007 E 10168453 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2256135**

54 Título: **Proteínas de fusión escindibles proteolíticamente que comprenden un Factor de la coagulación de la sangre**

30 Prioridad:

14.06.2006 EP 06012262

11.07.2006 US 819620 P

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

04.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**METZNER, HUBERT;
WEIMER, THOMAS y
SCHULTE, STEFAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 729 426 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

Proteínas de fusión escindibles proteolíticamente que comprenden un Factor de la coagulación de la sangre.

5 Introducción

La presente invención se refiere al campo de las proteínas de fusión terapéuticas modificadas con semivida aumentada comparada con sus polipéptidos terapéuticos precursores no modificados. La invención se refiere específicamente a factores de coagulación fusionados a polipéptidos mejoradores de la semivida (HLEPs) seleccionados del grupo constituido por inmunoglobulinas sin dominios de fijación de antígeno, que están conectadas por péptidos enlazadores que son escindibles proteolíticamente. La escisión de tales enlazadores libera el polipéptido terapéutico de cualquier impedimento estérico comprometedor de la actividad causado por el HLEP y permite por tanto la generación de proteínas de fusión, que retienen una actividad molar específica alta del factor de coagulación. En el caso en que las proteínas de fusión terapéuticas son zimógenos, se prefieren especialmente aquellos enlazadores que liberan el polipéptido terapéutico de modo esencialmente simultáneo con su activación in vivo después de exposición a la o las proteasas correspondientes. Otro aspecto de la presente invención es una velocidad de eliminación más rápida de un factor de coagulación dado una vez que el factor de coagulación se activa y el enlazador peptídico se escinde proteolíticamente de un modo relacionado con la coagulación comparado con la proteína de fusión correspondiente sin el enlazador escindible.

La idea de la invención se demuestra en particular por los polipéptidos dependientes de la vitamina K humana Factor IX, Factor VII, y Factor VIIa, pero el concepto puede aplicarse también a otros factores de la coagulación. Inmunoglobulinas sin dominios de fijación de antígeno, como el fragmento Fc sin un dominio de fijación de antígeno son los HLEPs. La invención se refiere también a secuencias de cDNA que codifican los polipéptidos terapéuticos y derivados de los mismos fusionados genéticamente a un cDNA codificante de HLEPs seleccionados del grupo constituido por inmunoglobulinas sin dominios de fijación de antígeno enlazados por oligonucleótidos que codifican enlazadores peptídicos interpuestos escindibles. Tales derivados codificados exhiben semivida y actividades molares específicas mejoradas que están aumentadas en comparación con sus homólogos no-escindibles. La invención se refiere también a vectores de expresión recombinantes que contienen tales secuencias de cDNA, células hospedadoras transformadas con tales vectores de expresión recombinantes, polipéptidos recombinantes y derivados que tienen de hecho actividades biológicas comparables al polipéptido terapéutico de tipo salvaje no modificado pero que tienen semividas mejoradas. La invención se refiere también a procesos para la fabricación de tales proteínas recombinantes y sus derivados. La invención abarca también un vector de transferencia para uso en terapia génica humana, que comprende tales secuencias de DNA modificadas útiles para aumentar la semivida in vivo.

35 Antecedentes de la invención

Están disponibles comercialmente varios polipéptidos terapéuticos recombinantes para uso terapéutico y profiláctico en humanos. Los pacientes se benefician en general del modo de acción específico de los ingredientes activos recombinantes, pero una desventaja en muchos casos es su disponibilidad limitada debido a sus procesos de fabricación costosos y complejos. Una reducción de la dosis o la frecuencia de administración necesarias de tales productos podría mejorar esta situación. Una frecuencia reducida de administración podría mejorar la comodidad para el paciente y, por tanto, también la aceptación de la terapia. Se han descrito varias soluciones para alcanzar la meta de una semivida in vivo aumentada después de la administración. Soluciones propuestas recientemente incluyen la formación de proteínas de fusión, especialmente en el caso de polipéptidos con una semivida in vivo breve que puede aumentarse significativamente por fusión a un HLEP.

Ballance et al. (WO 01/79271) han descrito polipéptidos de fusión de una multitud de polipéptidos terapéuticos diferentes que, cuando se fusionan a seroalbúmina humana, se predice que tienen una semivida funcional in vivo aumentada y vida útil prolongada. Se han descrito largas listas de socios potenciales de fusión sin demostración por datos experimentales para prácticamente cualquiera de estos polipéptidos de que las respectivas proteínas de fusión de albúmina retengan realmente actividad biológica y tengan propiedades mejoradas. Entre la lista de polipéptidos terapéuticos mencionados como Ejemplos se encuentran Factor IX y FVII/FVIIa. Se han descrito también fusiones de FIX y FVII/FVIIa en las cuales existe un enlazador peptídico entre albúmina y FIX o FVII/FVIIa. Sin embargo, no se sugiere el uso de péptidos enlazadores escindibles.

Sheffield et al. (Sheffield W. P. et al. (2004), Br. J. Haematol. 126: 565-573) expresó una proteína de fusión de albúmina con Factor IX murino compuesta de FIX murino, un enlazador de 8 aminoácidos (GPG₄TM), albúmina murina y un marcador peptídico de 22 aminoácidos, y también una proteína de fusión de albúmina con Factor IX humano compuesta de Factor IX humano, un enlazador de 7 aminoácidos (G₆V) y albúmina humana. Utilizando un ensayo de coagulación de una sola etapa, dependiente de FIX, las actividades molares específicas de la proteína de fusión FIX murino-albúmina (MFUST) y la proteína de fusión FIX humano-albúmina (HFUS) eran al menos 2 a 3 veces menores que la de sus homólogos no fusionados, un efecto atribuido al menos parcialmente a un proceso de activación proteolítica más lento por FXIa. Sheffield no utilizó ni sugirió la utilización de un enlazador escindible entre FIX y albúmina.

65 Varias solicitudes de patente describen la fusión de polipéptidos terapéuticos a regiones constantes de inmunoglobulina para prolongar la semivida de polipéptidos terapéuticos in vivo. WO 2002/04598, WO 2003/059935,

5 WO 2004/081053, WO 2004/101740 y WO 2005/001025 incluyen FIX como ejemplos para el resto del polipéptido terapéutico. Las dos últimas solicitudes de patente describen también FVII/FVIIa fusionado a regiones constantes de inmunoglobulina y encuentran que los homodímeros de proteínas de fusión tienen actividad de coagulación inferior comparados con proteínas de fusión constituidas por un monómero/dímero. Una vez más, no se sugiere el uso de péptidos enlazadores escindibles.

10 En WO 91/09125 se describen proteínas de fusión que están unidas por enlazadores que son escindibles por proteasas de la cascada de coagulación de la sangre, pero las proteínas de fusión están limitadas a las que comprenden proteínas fibrinolíticas o antitrombóticas.

15 En WO 03/068934 se describen moléculas quiméricas que están compuestas de al menos una primera molécula componente, al menos un enlazador y al menos una segunda molécula, en donde el enlazador comprende un sitio de escisión enzimática para producir un enlace no existente naturalmente y un sitio de escisión entre la primera y la segunda moléculas componentes y en donde, después de la escisión de la molécula quimérica en el sitio de escisión, al menos una de las moléculas componentes es funcionalmente activa. Las proteasas de escisión pueden ser factores de coagulación como trombina. Moléculas componentes descritas entre muchas otras son FIX y FVIIa. Sin embargo, no se describen las proteínas de fusión terapéuticas de la presente invención, ni las propiedades mejoradas de las proteínas de fusión terapéuticas de la presente invención tales como actividad molar específica aumentada, velocidad de desactivación y/o velocidades de eliminación aumentadas en comparación con la proteína terapéutica sin enlazadores escindibles. EP 1444986 se refiere a péptidos derivados del Factor VIII de la coagulación con semividas en plasma aumentadas. WO20044101739 se refiere a métodos de síntesis química de proteínas quiméricas que comprenden al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina y una molécula biológicamente activa. En WO2004021861 se debaten inhibidores que pueden ser desactivados por un reactivo producido por una célula diana.

25 Descripción de la invención

30 Existe una gran necesidad médica de factores de coagulación que tengan una semivida larga. En la técnica anterior, se han sugerido fusiones de factores de coagulación con polipéptidos mejoradores de la semivida para alcanzar este objetivo. Sin embargo, una vez que un factor de coagulación se activa durante la coagulación, sea por escisión proteolítica del zimógeno (como FIX) o por contacto de un Factor ya "pre"- activado proteolíticamente con un segundo polipéptido (como la fijación de FVIIa a Factor Tisular), ya no es deseable mantener la semivida larga del factor de coagulación ahora activado, dado que esto podría conducir a complicaciones tromboticas, como es ya el caso para un factor de coagulación de tipo salvaje como FVIIa (Aledort L. M., J Thromb Haemost 2(10): 1700-1708 (2004)) y podría ser incluso más relevante si el Factor activado tuviera una semivida aumentada. Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar factores de coagulación de vida larga, que después de la activación o después de la disponibilidad de un cofactor tengan una semivida comparable a la de un factor de coagulación no modificado.

40 Las fusiones de los factores de coagulación a polipéptidos mejoradores de la semivida como se describen en la técnica anterior y como se muestran también en los ejemplos 6 y 7 adolecen en general de una actividad molar específica reducida del factor de coagulación fusionado. Otro aspecto de la presente invención proporciona factores de coagulación con semivida mejorada, que muestran actividad molar específica aumentada comparados con la proteína de fusión terapéutica correspondiente sin un enlazador escindible.

45 La invención se refiere por tanto a proteínas de fusión terapéuticas que comprenden

- a) un factor de coagulación, o un fragmento del mismo,
- b) un polipéptido aumentador de la semivida seleccionado del grupo constituido por inmunoglobulinas sin dominios de fijación de antígeno, y
- 50 c) un enlazador peptídico que une el factor de coagulación o fragmento del mismo y el polipéptido aumentador de la semivida;

55 en donde el enlazador peptídico puede ser escindido por proteasas implicadas en la coagulación o activadas por enzimas de la coagulación y en el que la proteína de fusión terapéutica tiene, en comparación con la proteína de fusión terapéutica respectiva enlazada por un enlazador no-escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGV:

- (i) una actividad molar específica aumentada en al menos un ensayo relacionado con la coagulación; y
- (ii) una velocidad de eliminación aumentada del factor de coagulación activado después que el enlazador peptídico es escindido proteolíticamente en un modo relacionado con la coagulación.

60 La invención proporciona también un polinucleótido que codifica una proteína de fusión terapéutica de la invención.

La invención proporciona también un plásmido o vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

65 La invención proporciona también una célula hospedadora que comprende un polinucleótido, un plásmido, o un vector de la invención.

La invención proporciona también un método de producción de una proteína de fusión terapéutica de la invención, que comprende cultivar células hospedadoras de la invención en condiciones tales que se expresa la proteína de fusión terapéutica.

5 La invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión terapéutica de la invención, o un polinucleótido, un plásmido, o un vector de la invención.

La invención proporciona también una proteína de fusión terapéutica de la invención para uso como medicamento.

10 La invención proporciona también una proteína de fusión terapéutica de la invención para uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno de la coagulación de la sangre.

15 Como consecuencia del enlazador escindible, después de la escisión del enlazador peptídico en un modo relacionado con la coagulación, el factor de coagulación se asemeja más estrechamente al comportamiento del Factor nativo no fusionado y no exhibe una semivida aumentada del Factor activo con efecto potencialmente protrombótico.

20 La escisión proteolítica en un modo relacionado con la coagulación en el sentido de la invención, es cualquier escisión proteolítica que ocurre como consecuencia de la activación de al menos un Factor de la coagulación o cofactor de la coagulación.

25 La expresión "factor de coagulación activado después que el enlazador peptídico es escindido proteolíticamente en un modo relacionado con la coagulación" en el sentido de la invención significa que el factor de coagulación se activa prácticamente en paralelo con la escisión proteolítica del péptido enlazador, o que el factor de coagulación estaba ya activado ya antes de la escisión proteolítica del péptido enlazador. La activación puede ocurrir, por ejemplo, por escisión proteolítica del factor de coagulación o por fijación a un cofactor.

La proteína de fusión terapéutica puede tener una recuperación mejorada in vivo en comparación con la recuperación in vivo del factor de coagulación no modificado.

30 Se prefieren proteínas de fusión terapéuticas que tengan una recuperación mejorada in vivo, comparadas con el factor de coagulación no modificado en al menos 10%, más preferiblemente en al menos 25% y muy preferiblemente en 40% o más.

35 Los factores de coagulación preferidos son factores de coagulación dependientes de vitamina K y fragmentos y variantes de los mismos. Son aún más preferidos FVIIa y FIX y fragmentos y variantes de los mismos.

40 La región enlazadora en una realización preferida comprende una secuencia del polipéptido terapéutico a administrar o una variante del mismo, que debería dar como resultado un riesgo disminuido de propiedades neoantigénicas (formación de un nuevo epítipo potencialmente inmunógeno debido a la existencia de un péptido en el antígeno terapéutico que no existe en proteínas humanas) de la proteína de fusión expresada. Asimismo, en el caso en que la proteína terapéutica es un zimógeno (v. g. necesita ser activada proteolíticamente) la cinética de la escisión del enlazador peptídico reflejará más estrechamente la cinética de activación del zimógeno relacionada con la coagulación. Así, en tales realizaciones preferidas un zimógeno y un enlazador correspondiente se activan y se escinden respectivamente, con cinéticas comparables. Por esta razón, la presente invención se refiere también particularmente a proteínas de fusión de un zimógeno y un HLEP, donde la cinética de la escisión del enlazador por proteasas relevantes no se retarda en más de un Factor de 3, y muy preferiblemente no en más de un Factor de 2 comparada con la cinética de la activación del zimógeno.

45 En una realización adicional, el péptido enlazador comprende sitios de escisión para más de una proteasa. Esto puede conseguirse por un péptido enlazador que puede ser escindido en la misma posición por diferentes proteasas o por un péptido enlazador que proporciona dos o más sitios de escisión diferentes. Esto puede ser ventajoso en circunstancias en las que la proteína de fusión terapéutica tiene que ser activada por escisión proteolítica para conseguir actividad enzimática y en las que proteasas diferentes puedan contribuir a este paso de activación. Éste es el caso, por ejemplo, después de la activación de FIX, que puede ser conseguida por FXIa o por FVIIa/Factor Tisular (TF).

50 Realizaciones preferidas de la invención son proteínas de fusión terapéuticas en las cuales el enlazador es escindible por la proteasa, que activa el factor de coagulación, asegurando con ello que la escisión del enlazador está unida a la activación del factor de coagulación en un sitio en el que ocurre coagulación.

55 Otras proteínas de fusión terapéuticas preferidas conforme a la invención son aquéllas en las cuales el enlazador es escindible por el factor de coagulación que forma parte de la proteína de fusión terapéutica una vez que se activa la misma, asegurando así también que la escisión de la proteína de fusión está conectada con un evento de coagulación.

60 Otras proteínas de fusión terapéuticas preferidas conforme a la invención son aquéllas en las cuales el enlazador es escindible por una proteasa, que es activada por sí misma directamente o indirectamente por la actividad del factor de coagulación que forma parte de la proteína de fusión terapéutica, asegurando así también que la escisión de la proteína de fusión está conectada con un evento de coagulación.

Una clase de proteínas de fusión terapéuticas muy preferidas son aquéllas en las cuales el enlazador es escindible por FXIa y/o por FVIIa/TF y el factor de coagulación es FIX.

5 La invención se refiere también a secuencias de cDNA que codifican cualesquiera otros factores de coagulación que pueden ser activados proteolíticamente o que están implicados en la activación de otros zimógenos o polipéptidos. Estos cDNAs están fusionados genéticamente a secuencias de cDNA que codifican inmunoglobulinas humanas sin dominios de fijación de antígeno, y están enlazados por oligonucleótidos que codifican enlazadores peptídicos escindibles interpuestos. Las proteínas de fusión terapéuticas expresadas exhiben actividades molares específicas que están
10 aumentadas en comparación con sus homólogos no-escindibles. La invención se refiere también a vectores de expresión recombinantes que contienen tales secuencias de cDNA fusionadas, células hospedadoras transformadas con tales vectores de expresión recombinantes, proteínas de fusión terapéuticas recombinantes y derivados que tienen actividades biológicas cuasi comparables con los polipéptidos terapéuticos de tipo salvaje no modificados pero que tienen semivida aumentada in vivo. La invención se refiere también a procesos para la fabricación de tales polipéptidos recombinantes y sus derivados. La invención abarca también un vector de transferencia para uso en terapia génica humana, que comprende tales secuencias de DNA modificadas útiles para aumentar los niveles de producto in vivo.

Proteínas de fusión terapéuticas preferidas conforme a la invención son aquéllas que tienen una actividad molar específica, en particular una actividad molar específica en al menos un ensayo relacionado con la coagulación que está
20 aumentada al menos 25% comparada con la de una proteína de fusión terapéutica sin un enlazador escindible. Son más preferidas proteínas de fusión terapéuticas en las cuales la actividad molar específica está aumentada al menos un 50%, y son aún más preferidas aquéllas en las cuales la actividad molar específica está aumentada al menos un 100%, en al menos uno de los diferentes ensayos disponibles relacionados con la coagulación.

25 Realizaciones preferidas adicionales de la presente invención son proteínas de fusión terapéuticas, en las cuales la velocidad de desactivación del factor de coagulación activado después de escisión del enlazador peptídico que une el factor de coagulación al polipéptido mejorador de la semivida está aumentada en al menos 10% comparada con la velocidad de desactivación del factor de coagulación activado en una proteína de fusión terapéutica correspondiente sin un enlazador escindible. Son más preferidas proteínas de fusión terapéuticas en las cuales la velocidad de desactivación
30 está aumentada en al menos 25%, y aún más preferidas aquéllas en las cuales la velocidad de desactivación está aumentada en al menos 50%.

Realizaciones preferidas adicionales de la presente invención son proteínas de fusión terapéuticas, en las cuales la velocidad de eliminación del factor de coagulación después de escisión del enlazador peptídico que une el factor de coagulación al polipéptido mejorador de la semivida está aumentada en al menos 10% comparada con la velocidad de
35 eliminación del factor de coagulación en una proteína de fusión terapéutica correspondiente sin un enlazador escindible. Son más preferidas proteínas de fusión terapéuticas en las cuales la velocidad de eliminación está aumentada en al menos 25%, y aún más preferidas aquéllas en las cuales la velocidad de eliminación está aumentada en al menos 50%.

40 Descripción detallada de la invención

Polipéptidos dependientes de vitamina K

45 Polipéptidos dependientes de vitamina K como un grupo de los polipéptidos terapéuticos son polipéptidos que se carboxilan enzimáticamente en posición γ en el hígado utilizando vitamina K como cofactor. Tales polipéptidos dependientes de vitamina K son v. g. los factores II, VII, IX, X, Proteína C, Proteína S, GAS6, y Proteína Z.

FIX humano

50 FIX humano, un miembro del grupo de polipéptidos dependientes de vitamina K, es una glicoproteína monocatenaria con un peso molecular de 57 kDa, que es secretada por las células del hígado en el torrente sanguíneo como un zimógeno inactivo de 415 aminoácidos. El mismo contiene 12 residuos de ácido γ -carboxi-glutámico localizados en el dominio Gla N-terminal del polipéptido. Los residuos Gla requieren vitamina K para su biosíntesis. Después del dominio Gla existen dos dominios de Factor de crecimiento epidérmico, un péptido de activación, y un dominio de serina-proteasa tipo tripsina. Modificaciones adicionales posteriores a la traducción de FIX abarcan hidroxilación
55 (Asp 64), N-(Asn157 y Asn167) así como glicosilación tipo O (Ser53, Ser61, Thr159, Thr169, y Thr172), sulfatación (Tyr155), y fosforilación (Ser158).

60 FIX se convierte en su forma activa, Factor IXa, por proteólisis del péptido de activación en Arg145-Ala146 y Arg180-Val181 que conduce a la formación de dos cadenas polipeptídicas, una cadena ligera N-terminal (18 kDa) y una cadena pesada C-terminal (28 kDa), que se mantienen unidas por un puente disulfuro. La escisión de activación del Factor IX puede ocurrir in vitro e. g. por Factor XIa o Factor VIIa/TF. El Factor IX está presente en el plasma humano en una concentración de of 5-10 μ g/ml. Se ha encontrado que la semivida terminal en plasma del Factor IX en humanos es aproximadamente 15 a 18 horas (White GC et al. 1997. Recombinant Factor IX. Thromb Haemost. 78: 261-265; Ewenstein BM et al. 2002. Pharmacokinetic analysis of plasma-derived and recombinant FIX concentrates in previously treated patients with moderate or severe hemophilia B. Transfusion 42:190-197).

La hemofilia B está causada por Factor IX no funcional o ausente, y se trata con concentrados de Factor IX de plasma o una forma recombinante de Factor IX. Dado que los pacientes de hemofilia B reciben a menudo al menos administraciones profilácticas bisemanales de Factor IX a fin de evitar hemorragias espontáneas, es deseable aumentar los intervalos entre administraciones por aumento de la semivida del producto Factor IX aplicado. Una mejora de la semivida en plasma podría aportar un beneficio importante al paciente. Hasta ahora no está disponible comercialmente ninguna preparación farmacéutica de un Factor IX con semivida en plasma mejorada ni se ha publicado dato alguno que exhiba variantes de FIX con semivida in vivo prolongada y actividad molar específica prácticamente inalterada en ensayos basados en coagulación. Por tanto, existe todavía una gran necesidad médica de desarrollar formas de Factor IX que tengan una semivida funcional in vivo más larga.

Factor VII y Factor VIIa

FVII es una glicoproteína monocatenaria que tiene un peso molecular de 50 kDa, que es secretada por las células del hígado en el torrente sanguíneo como un zimógeno inactivo de 406 aminoácidos. FVII se convierte en su forma activa Factor VIIa, por proteólisis del enlace peptídico simple en Arg152-Ile153 conduciendo a la formación de dos cadenas polipeptídicas, una cadena ligera N-terminal (24 kDa) y una cadena pesada C-terminal (28 kDa), que se mantienen unidas por un puente disulfuro. En contraste con otros factores de la coagulación dependientes de vitamina K, no se escinde péptido de activación alguno durante la activación. La escisión de activación del Factor VII puede lograrse in vitro, por ejemplo, por Factor Xa, Factor IXa, Factor VIIa, Factor XIIa, Proteasa Activadora del Factor Siete (FSAP), y trombina. Mollerup et al. (Biotechnol. Bioeng. (1995) 48: 501-505) consiguieron que ocurre también cierta escisión en la cadena pesada en Arg290 y/o Arg315.

El Factor VII está presente en plasma en una concentración de 500 ng/ml. Aproximadamente 1% o 5 ng/ml de Factor VII está presente como Factor VIIa activado. Se ha encontrado que la semivida terminal en plasma del Factor VII es aproximadamente 4 horas y la del Factor VIIa aproximadamente 2 horas.

Por administración de concentraciones suprafisiológicas de Factor VIIa puede conseguirse la hemostasis obviando la necesidad de Factor VIIIa y Factor IXa. La clonación del cDNA para Factor VII (US 4. 784. 950) hizo posible desarrollar Factor VII activado como producto farmacéutico. El Factor VIIa se administró con éxito por primera vez en 1988. Desde entonces el número de indicaciones de Factor VIIa ha aumentado constantemente exhibiendo un potencial para llegar a ser un agente hemostático universal para la detención de las hemorragias (Erhardtsen, 2002). Sin embargo, la corta semivida terminal de Factor VIIa de aproximadamente 2 horas y su reducida recuperación in vivo están limitando su aplicación. Por tanto, existe todavía una gran necesidad médica de desarrollar formas de Factor VIIa que tengan una semivida mejorada, pero por otra parte actividad molar específica, cinética de desactivación, y/o cinética de eliminación prácticamente inalterables después del comienzo de la coagulación.

Proteínas de fusión terapéuticas

Las "proteínas de fusión terapéuticas" en el sentido de esta invención son factores de coagulación fusionados a un polipéptido mejorador de la semivida que, después de la administración a un humano o animal, pueden producir un efecto profiláctico o terapéutico. Estas proteínas de fusión terapéuticas pueden administrarse a un humano o un animal por vía intravenosa, intramuscular, oral, tópica, parenteral u otras rutas. Clases específicas de proteínas de fusión terapéuticas abarcan, a saber, por los ejemplos de esta invención, son factores de coagulación como v. g. polipéptidos dependientes de vitamina K enlazados a polipéptidos mejoradores de la semivida que son inmunoglobulinas sin dominios de fijación de antígeno. La expresión "proteína de fusión terapéutica" se utiliza de modo intercambiable con "proteína de fusión".

Polipéptido mejorador de la semivida (HLEP)

Albúmina, miembros de la familia de albúmina e inmunoglobulinas y sus fragmentos o derivados se han descrito arriba como ejemplos de polipéptidos mejoradores de la semivida (HLEPs). Las expresiones "seroalbúmina humana" (HSA) y "albúmina humana" (HA) se utilizan intercambiabilmente en esta solicitud. Los términos "albúmina" y "seroalbúmina" son más amplios, y abarcan seroalbúmina humana (y fragmentos y variantes de la misma) así como albúmina de otras especies (y fragmentos y variantes de la misma).

Como se utiliza en esta memoria, "albúmina" se refiere colectivamente al polipéptido o secuencia de aminoácidos de albúmina, o un fragmento o variante de albúmina que tiene una o más actividades funcionales (v. g., actividades biológicas) de albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a albúmina humana o fragmentos de la misma, especialmente la forma madura de albúmina humana como se muestra en SEQ ID No:1 en esta memoria o albúmina de otros vertebrados o fragmentos de la misma, o análogos o variantes de estas moléculas o fragmentos de los mismos.

La porción albúmina de las proteínas de fusión de albúmina descritas puede comprender la longitud total de la secuencia HA como se ha descrito arriba, o puede incluir uno o más fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica. Tales fragmentos pueden ser de 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50, o más aminoácidos contiguos de la secuencia HA o pueden incluir parte o la totalidad de dominios específicos de HA.

5 La porción albúmina de las proteínas de fusión de albúmina descritas en esta memoria puede ser una variante de HA normal, sea natural o artificial. La porción del polipéptido terapéutico de las proteínas de fusión de la invención pueden ser también variantes de los polipéptidos terapéuticos correspondientes que se describen en esta memoria. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones, y sustituciones, sean conservadoras o no-conservadoras, naturales o artificiales, donde tales cambios no alteran sustancialmente el sitio activo, o dominio activo que confiere las actividades terapéuticas de los polipéptidos terapéuticos.

10 En particular, las proteínas de fusión de albúmina descritas en esta memoria pueden incluir variantes polimórficas de albúmina humana y fragmentos de albúmina humana existentes naturalmente. La albúmina puede derivarse de cualquier vertebrado, especialmente de cualquier mamífero, por ejemplo, humano, vaca, oveja, o cerdo. Albúminas no de mamífero incluyen, pero sin carácter limitante, gallina y salmón. La porción albúmina del polipéptido unido a albúmina puede ser de un animal diferente que la porción del polipéptido terapéutico.

15 Hablando en términos generales, un fragmento o variante de albúmina tendrá al menos 10, preferiblemente al menos 40, y muy preferiblemente más de 70 aminoácidos de longitud. La variante de albúmina puede estar constituida preferentemente por o comprender alternativamente al menos un dominio completo de albúmina o fragmentos de dichos dominios, por ejemplo los dominios 1 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO:1), 2 (aminoácidos 195-387 de SEQ ID NO: 1), 3 (aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 1), 1 + 2 (1-387 de SEQ ID NO: 1), 2 + 3 (195-585 de SEQ ID NO: 1) ó 1 + 3
20 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 1 + aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 1). Cada dominio está constituido en sí mismo por dos subdominios homólogos, a saber 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, con regiones enlazadoras flexibles inter-subdominios que comprenden los residuos Lys106 a Glu119, Glu292 a Val315, y Glu492 a Ala511.

25 La porción albúmina de una proteína de fusión de albúmina descrita en esta memoria puede comprender al menos un subdominio o dominio de HA o modificaciones conservadoras del mismo.

30 Todos los fragmentos y variantes de albúmina están abarcados por la descripción como socios de fusión de un factor de coagulación con tal que los mismos conduzcan a un aumento de la semivida de la proteína terapéutica de fusión en plasma de al menos 25% comparado con el factor de coagulación no fusionado.

Además de la albúmina, se ha reivindicado que la alfa-fetoproteína, otro miembro de la familia de albúmina, mejora la semivida in vivo de un polipéptido terapéutico unido (WO 2005/024044). La familia de albúmina de proteínas, proteínas de transporte del suero evolutivamente afines, está constituida por albúmina, alfa-fetoproteína (AFP; Beattie & Dugaiczky 1982. Gene 20:415-422), afamina (AFM; Lichenstein et al. 1994. J. Biol. Chem. 269:18149-18154) y proteína de fijación de vitamina D (DBP; Cooke & David 1985. J. Clin. Invest. 76:2420-2424). Sus genes representan un grupo multigénico con semejanzas estructurales y funcionales que mapean en la misma región cromosómica en humanos, ratones y ratas. La semejanza estructural de los miembros de la familia de albúmina sugiere su utilidad como HLEPs. Por esta razón, se describe también en esta memoria el uso de tales miembros de la familia de albúmina, fragmentos y variantes de los mismos como HLEPs. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, sean conservadoras o no-conservadoras, con tal que esté presente todavía la función deseada.
40

Los miembros de la familia de albúmina pueden comprender la longitud total de la proteína AFP, AFM y DBP respectiva, o pueden incluir uno o más fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica. Tales fragmentos pueden ser de 10 o más aminoácidos de longitud, o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50, o más aminoácidos contiguos de la secuencia proteínica respectiva o pueden incluir parte o la totalidad de dominios específicos de la proteína respectiva, con tal que los fragmentos HLEP proporcionen una prolongación de la semivida de al menos 25% en comparación con el factor de coagulación no fusionado. Los miembros de la familia de albúmina de las proteínas de fusión terapéuticas descritas en esta memoria pueden incluir variantes polimórficas de AFP, AFM y DBP existentes naturalmente.
45
50

Pueden utilizarse también como HLEPs IgG y fragmentos de IgG sin dominios de fijación de antígeno, con tal que los fragmentos HLEP proporcionen una extensión de la semivida de al menos 25% en comparación con el factor de coagulación no fusionado. La porción del polipéptido terapéutico está conectada a la IgG o los fragmentos de IgG sin dominios de fijación de antígeno por un enlazador escindible que permite actividades molares específicas altas de la proteína de fusión. Ejemplos para moléculas de fusión Factor VII/VIIa y Factor IX IgG se encuentran, v. g., en WO 2005/001025. Dicho documento da a conocer, a saber, un homodímero que comprende dos moléculas de Factor VII (Factor VIIa) y dos moléculas Fc y un híbrido monómero/dímero constituido por una molécula FVII (FVIIa) y dos moléculas Fc, exhibiendo el monómero/dímero una actividad de coagulación aproximadamente cuatro veces mayor que el homodímero. Una secuencia enlazadora de la presente invención que libere las moléculas FVII (FVIIa) después de escisión por una proteasa de la cascada de coagulación como, v. g., FXIa, FXa, o FIXa podría aumentar la actividad de coagulación de los constructos y especialmente la del homodímero hasta un nivel de actividad comparable al homodímero/dímero o incluso mayor. Una proteína de fusión FIX-Fc con enlazador escindible se muestra ilustrativamente en SEQ ID No 93. En este caso pueden aplicarse enlazadores escindibles tales como los representados en la Tabla 3a y 3b.
55
60
65

La invención se refiere específicamente a proteínas de fusión que comprenden enlazar un factor de coagulación o fragmento del mismo al término N o C de un HLEP seleccionado del grupo constituido por inmunoglobulinas sin dominios de fijación de antígeno o tal que se introduce un enlazador peptídico escindible interpuesto entre el polipéptido terapéutico y el HLEP de tal manera que la proteína de fusión formada tiene una semivida in vivo aumentada comparada con el factor de coagulación que no se ha enlazado a un HLEP y que la proteína de fusión tiene una actividad molar específica al menos 25% mayor comparada con la proteína de fusión correspondiente con enlazador no-escindible en al menos uno de los diferentes ensayos relacionados con la coagulación disponibles.

La expresión "factor de coagulación" como se utiliza en esta solicitud incluye, pero sin carácter limitante, polipéptidos constituidos por Factor IX, Factor VII, Factor VIII, Factor von Willebrand, Factor V, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, Factor I, Factor II (Protrombina), Proteína C, Proteína S, GAS6, o Proteína Z, así como sus formas activadas. Adicionalmente, polipéptidos terapéuticos útiles pueden ser polipéptidos de tipo salvaje o pueden contener mutaciones. El grado y la localización de la glicosilación u otras modificaciones posteriores a la traducción pueden variar dependiendo de las células hospedadoras seleccionadas y de la naturaleza del entorno celular del hospedador. Cuando se hace referencia a secuencias de aminoácidos específicas, están abarcadas en esta solicitud modificaciones posteriores a la traducción de tales secuencias.

La expresión "factor de coagulación" dentro de la definición anterior incluye polipéptidos que tienen la secuencia natural de aminoácidos que incluye cualesquiera polimorfismos naturales. La misma incluye también polipéptidos con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N-terminal o C-terminal modificado que incluye deleciones o adiciones de aminoácidos terminales, con tal que dichos polipéptidos retengan sustancialmente la actividad del polipéptido terapéutico respectivo. Las variantes incluidas difieren en uno o más residuos de aminoácido de secuencia de tipo salvaje. Ejemplos de tales diferencias pueden incluir truncación del término N y/o C en uno o más residuos de aminoácido (v. g., preferiblemente 1 a 30 residuos de aminoácido), o la adición de uno o más residuos extra en el término N y/o C, así como sustituciones de aminoácidos conservadoras, es decir sustituciones realizadas en grupos de aminoácidos con características similares, v. g. (1) aminoácidos pequeños, (2) aminoácidos de carácter ácido, (3) aminoácidos polares, (4) aminoácidos de carácter básico, (5) aminoácidos hidrófobos, y (6) aminoácidos aromáticos. Ejemplos de tales sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla siguiente.

Tabla 1

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

La semivida in vivo de las proteínas de fusión de la invención, determinada en general como semivida terminal o semivida β , es por lo general al menos aproximadamente 25%, con preferencia al menos aproximadamente 50%, y de modo más preferible más de 100% mayor que la semivida in vivo del polipéptido no fusionado.

Las proteínas de fusión de la presente invención tienen al menos un 25%, con preferencia al menos un 50%, con más preferencia una actividad molar específica aumentada al menos 100% en comparación con las proteínas de fusión correspondientes sin enlazadores escindibles.

A este respecto, la actividad molar específica (o actividad molar específica relacionada con la coagulación como se considera en particular aquí) se define como la actividad expresada por mol (o v. g. nmol) del polipéptido terapéutico o proteína de fusión terapéutica de interés. El cálculo de la actividad molar específica permite una comparación directa de la actividad de los diferentes constructos que no se ve afectada por los diferentes pesos moleculares o densidades ópticas de los polipéptidos estudiados. La actividad molar específica puede calcularse como se ilustra en la Tabla 2 a continuación para FIX y una proteína de fusión FIX-HSA.

Tabla 2: Cálculo de la actividad molar específica como se muestra para una proteína de fusión FIX-HSA

Producto	DO _(280nm, 1%)	PM	Actividad /Vol/DO ₂₈₀ (UI/L/DO ₂₈₀)	Densidad óptica molar (DO ₍₂₈₀₎ a 1 mol/L)	Cálculo de la actividad molar específica (UI/mol)
FIX	13,3 ¹⁾	57 000	determinada para el producto	75810 (= PM x DO _{(280, 1%)/10})	=(Actividad/Vol/DO ₂₈₀) x (DO ₂₈₀ a 1 mol/L)

Producto	DO _(280nm, 1%)	PM	Actividad /Vol/DO ₂₈₀ (UI/L/DO ₂₈₀)	Densidad óptica molar (DO ₍₂₈₀₎ a 1 mol/L)	Cálculo de la actividad molar específica (UI/mol)
HSA	5,7 ²⁾	66 300		37791 (= PM x DO _{(280, 1%)/10})	
FIX-HSA			determinada para el producto	113601 (= suma de la densidad óptica molar de FIX y HSA)	= (Activity/Vol/DO ₂₈₀) x (DO ₂₈₀ a 1 mol/L)
1) R. G. Di Scipio et al., Biochem. 16: 698-706 (1977) 2) C. Chaudhury et al, J. Exp. Med. 197(3): 315-322 (2003)					

Con objeto de determinar una actividad molar específica relacionada con la coagulación, puede utilizarse cualquier ensayo que determine las actividades enzimáticas o de cofactor que son relevantes para el proceso de coagulación.

5 En este caso, "ensayo relacionado con la coagulación" en el sentido de la invención es cualquier ensayo que determine las actividades enzimáticas o de cofactor que son de relevancia en el proceso de coagulación o que son capaces de determinar que se ha activado la cascada de coagulación intrínseca o la extrínseca. El ensayo "relacionado con la coagulación" puede ser por tanto un ensayo de coagulación directa como aPTT, PT, o los ensayos de generación de trombina. Sin embargo, están incluidos también otros ensayos tales como, v. g., ensayos cromógenos aplicados para factores de coagulación específicos. Ejemplos de tales ensayos o reactivos correspondientes son Pathromtin® SL (ensayo aPTT, Dade Behring) o Thromborel® S (ensayo de Tiempo de Protrombina, Dade Behring) con plasma deficiente en el factor de coagulación correspondiente (Dade Behring), kits de ensayos de generación de trombina (Technoclone, Thrombinoscope) que utilizan v. g. plasma deficiente en factores de coagulación, ensayos cromógenos como Biophen Factor IX (Hyphen BioMed), Staclot® FVIIa-rTF (Roche Diagnostics GmbH), Coatest® Factor VIII:C/4 (Chromogenix), u otros.

15 Para los propósitos de esta invención, un aumento en uno cualquiera de los ensayos anteriores o un ensayo equivalente relacionado con la coagulación se considera que exhibe un aumento en la actividad molar específica. Por ejemplo, un aumento de 25% se refiere a un aumento de 25% en cualquiera de los ensayos anteriores o un ensayo equivalente.

20 Para determinar si las proteínas de fusión terapéuticas caen dentro del alcance de la presente invención, el estándar contra el cual se compara la actividad molar específica de estas proteínas es un constructo en el cual el factor de coagulación respectivo y el HLEP respectivo están unidos por un enlazador no-escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGV.

25 En el caso de FIX, se utilizan a menudo ensayos aPTT para la determinación de la actividad de coagulación. Un ensayo de coagulación de este tipo (ensayo aPTT) se describe en el ejemplo 5 con más detalle. Sin embargo, pueden aplicarse otros ensayos o principios de ensayo relacionados con la coagulación a fin de determinar la actividad molar específica para FIX.

30 Los fármacos constituidos por polipéptidos terapéuticos recombinantes son usualmente caros y no todos los países pueden proporcionar terapias costosas basadas en tales fármacos. El aumento de la recuperación in vivo de tales fármacos podría hacer más barato el uso de estos productos y subsiguientemente podrían beneficiarse de ellos más pacientes. En el caso de las proteínas de fusión de la presente invención, una mayor recuperación in vivo sería también una ventaja deseable. "Recuperación in vivo" en el sentido de la invención significa la cantidad de producto encontrada en sangre o plasma poco después de la administración del producto. Por tanto, para la detección de la recuperación in vivo en general se determina el contenido en plasma unos pocos minutos (v. g. 5 ó 15 minutos) después de la administración del producto.

35 Aunque es deseable lograr una recuperación in vivo alta y una semivida larga para un factor de coagulación no-activado, es ventajoso limitar la semivida de un factor de coagulación después de su activación o de la activación de su cofactor a fin de evitar un riesgo protrombótico. Por tanto, después que se ha iniciado el proceso de coagulación, debería reducirse de nuevo la semivida del factor de coagulación activo. Esto puede lograrse por aumento de la desactivación de un modo relacionado con la coagulación o por eliminación del factor de coagulación.

40 La desactivación conforme a la presente invención significa la disminución de actividad del polipéptido terapéutico que puede estar causada, por ejemplo, por formación de un complejo entre un factor de coagulación y un inhibidor del factor de coagulación correspondiente o por escisión proteolítica ulterior como se conoce, v. g., en el caso de FVIII y FV.

45 La velocidad de desactivación de una proteína de fusión terapéutica activada se define como la velocidad de disminución de la actividad, v. g., por reacción con inhibidores o por desactivación proteolítica. La velocidad de desactivación puede medirse siguiendo la actividad molar específica del factor de coagulación activado a lo largo del tiempo en presencia de

cantidades fisiológicas de inhibidores de este factor de coagulación. Alternativamente, la velocidad de desactivación puede determinarse después de la administración del producto activado a un animal seguido por ensayo de muestras de plasma en un marco de tiempo apropiado utilizando ensayos de actividad y antígeno.

5 Cuando en el caso de las proteínas de fusión terapéuticas es necesaria una determinación de si estas proteínas caen dentro del alcance de la presente invención, el estándar contra el cual se compara la velocidad de desactivación de estas proteínas terapéuticas es un constructo en el cual el factor de coagulación respectivo y el HLEP respectivo están unidos por un enlazador no-escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGV.

10 La velocidad de eliminación de una proteína de fusión terapéutica activada se define como la velocidad a la que el polipéptido se elimina de la circulación de humanos o animales. La velocidad de eliminación puede determinarse por medida de la farmacocinética de la proteína de fusión terapéutica activada después de administración intravenosa. Utilizando un ensayo de antígeno, la eliminación puede determinarse por retirada directa de la circulación. Utilizando adicionalmente un ensayo de actividad, puede determinarse una velocidad específica de eliminación y desactivación.

15 Cuando, en el caso de las proteínas de fusión terapéuticas es necesaria una determinación de si estas proteínas caen dentro del alcance de la presente invención, el estándar contra el cual se compara la velocidad de desactivación de estas proteínas terapéuticas es un constructo en el cual el factor de coagulación respectivo y el HLEP respectivo están unidos por un enlazador no-escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGV.

20 Conforme a esta invención, el resto del polipéptido terapéutico está acoplado al resto HLEP por un enlazador peptídico escindible. El enlazador debería ser no-inmunógeno y debería ser suficientemente flexible para permitir la escisión por proteasas. La escisión del enlazador debería transcurrir con rapidez comparable a la activación del polipéptido terapéutico dentro de la proteína de fusión, si la proteína de fusión es un zimógeno.

25 El enlazador escindible comprende preferiblemente una secuencia derivada

- 30 a) del polipéptido terapéutico a administrar propiamente dicho si el mismo contiene sitios de escisión proteolítica que se escinden proteolíticamente durante la activación del polipéptido terapéutico,
 b) de un polipéptido sustrato de este polipéptido terapéutico, o
 c) de un polipéptido sustrato escindido por una proteasa que se activa o se forma por la implicación directa o indirecta del polipéptido terapéutico.

35 En una realización más preferida, la región enlazadora comprende una secuencia del polipéptido terapéutico a aplicar, lo cual debería dar como resultado un riesgo disminuido de propiedades neoantigénicas de la proteína de fusión expresada. Asimismo, en el caso en que la proteína terapéutica es un zimógeno (v. g. necesita ser activada proteolíticamente) la cinética de la escisión del enlazador peptídico reflejará más estrechamente la cinética de activación del zimógeno relacionada con la coagulación.

40 Como se describe en esta memoria, el polipéptido terapéutico es zimógeno FIX y el HLEP es albúmina. En este caso, la secuencia enlazadora se deriva, o bien de las secuencias de las regiones de activación de FIX, de la región de escisión de cualquier sustrato de FIX como FX o FVII o de la región de escisión de cualquier polipéptido sustrato que es escindido por una proteasa en cuya activación está implicado FIXa.

45 En una realización muy preferida, el péptido enlazador se deriva de FIX propiamente dicho. En otra realización preferida, el péptido enlazador se deriva de FX o FVII. En otra realización preferida, la secuencia enlazadora comprende dos secuencias de escisión que pueden ser escindidas por FXIa o FVIIa/TF, dos activadores de FIX fisiológicamente relevantes.

50 Combinaciones ilustrativas de polipéptido terapéutico, enlazador escindible y HLEP seleccionadas del grupo constituido por inmunoglobulinas sin dominios de fijación de antígeno se incluyen en los constructos enumerados en las tablas 3a y 3b, pero sin limitarse a éstas:

Tabla 3a: Ejemplos de constructos posibles

factor de coagulación	Enlazador	HLEP	Enlazador derivado de (con modificaciones, en caso aplicable)	SEQ ID NO:
	Enlazador no-escindible o no-escindible con suficiente rapidez			
FIX	-	HSA		
FIX	RI	HSA		
FIX	GGGGGV(Sheffield et al.)	HSA		94
FIX	(GGS) _n GS	HSA		
FIX	SS(GGS) ₇ GS	HSA		30
FIX	SSNGS(GGS) ₃ NGS(GGS) ₃ GGNGS	HSA		31
	Enlazador con un solo sitio de escisión			
FIX (1-412)	SVSQTSKLTRAETVFPDVD	HSA	FIX	36
FIX (1-412)	SVSQTSKLTRTAETVFPDVD GS	HSA	FIX	37
FIX	SVSQTSKLTRAETVFPDVD	HSA	FIX	38
FIX	SVSQTSKLTRAETVFPDVD GS GGS	HSA	FIX	95
FIX	SVSQTSKLTRAETVFPDVD GS	HSA	FIX	39
FIX	SVSQTSKLTRAETVFPDVD NGS	HSA	FIX	40
FIX	SVSQTSKLTRAETVFPDV	HSA	FIX	96
FIX	QTSKLTR AETVFPDV	HSA	FIX	97
FIX	SKLTRAETVFPDV	HSA	FIX	98
FIX	SVSQTSKLTRAETVFP	HSA	FIX	99
FIX	SVSQTSKLTRAETVF	HSA	FIX	100
FIX	QTSKLTR AETVF	HSA	FIX	101
FIX	SKLTRAETVF	HSA	FIX	102
FIX	SVSQTSKLTRAET	HSA	FIX	103
FIX	QTSKLTR AET	HSA	FIX	104
FIX	SKLTRAET	HSA	FIX	105
FIX	SVSQTSKLTRGETVFPDVD	HSA	FIX	41
FIX	SVSQTSKLTRTETVFPDVD	HSA	FIX	42
FIX	SVSQTSKLTRSETVFPDVD	HSA	FIX	43
FIX	SVSQTSKLTRLETVFPDVD	HSA	FIX	44
FIX	SVSQTSKLTRTEAVFPDVD	HSA	FIX	45
FIX	SVSQTSKLTRGEAVFPDVD	HSA	FIX	46
FIX	QTSKLTRAETVFPDVD GS	HSA	FIX	106
FIX	SKLTRAETVFPDVD GS	HSA	FIX	107
FIX	SKLTRAETVFPDVD	HSA	FIX	47
FIX	QSFNDFTRWGGED	HSA	FIX	48

ES 2 729 426 T3

Enlazador con un solo sitio de escisión				
FIX	QSFNDFTR WGGED GS	HSA	FIX	49
FIX	QSFNDFTRVVGGE	HSA	FIX	108
FIX	QSFNDFTRTVGGED	HSA	FIX	50
FIX	QSFNDFTRLVGGED	HSA	FIX	51
FIX	QSFNDFTRGVGGED	HSA	FIX	52
FIX	QSFNDFTRVVGGED NGS	HSA	FIX	53
FIX	QSFNDFTRVVGGEDN	HSA	FIX	54
FIX	PERGDNNLTRIVGGQE GS	HSA	FX	109
FIX	PERGDNNLTRIVGGQE	HSA	FX	61
FIX	PERGDNNLTRIVGGQ	HSA	FX	110
FIX	DNNLTRIVGGQ	HSA	FX	111
FIX	SVSQTSKLTRAETVFPDVD	Fc	FIX	62
FIX	QSFNDFTRVVGGED N	Fc	FIX	63
FIX (1-412)	SVSQTSKLTR AETVFPDVD	Fc	FIX	64
FIX	ASKPQGRIVGG	HSA delDAH	FVII	112
FIX	KRNASKPQGRIVGGKV	HSA	FVII	65
FIX	PEEPQLRMKNNEEAED	HSA	FVIII	66
FIX	DNSPSFIQIRSVAKKHPKT	HSA	FVIII	67
FIX	LSKNNAIEPRSFQNSRHPS	HSA	FVIII	68
FIX	DEDENQSPRSFQKKTRHYFIA	HSA	FVIII	69
FIX	SPHVLRNRAQSGSVPQ	HSA	FVIII	70
FVII o FVIIa	PEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDS	HSA	FVIII	71
FVII o FVIIa	DDDNSPSFIQIR SVAKKHPKTWVHYAAEEED	HSA	FVIII	72
FVII o FVIIa	LSKNNAIEPR SFQNSRHHPSTRQKQFNA	HSA	FVIII	73
FVII o FVIIa	DEDENQSPR SFQKKTRH YFIAA	HSA	FVIII	74
FVII o FVIIa	DYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVFQEFT	HSA	FVIII	75
FVIII	Derivado de los sitios de escisión de FVIII, FIX, o Fibrinógeno	HSA	FVIII, FIX o Fgn	
VWF	Derivado de los sitios de escisión de VWF, FVIII o FIX	HSA	FIX, FVIII, VWF	
VWF	DIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIA	HSA	FVIII	76
VWF	DNSPSFIQIRSVAKKHP	HSA	FVIII	77
VWF	LSKNNAIEPRSFQNSRHPS	HSA	FVIII	78

En el caso de enlazadores derivados de la región N-terminal del péptido de activación de FIX, conforme al polimorfismo natural T148-A148, las secuencias pueden contener también A en lugar de T en esta posición.

Tabla 3b: Ejemplos de constructos posibles con dos o más sitios de escisión

factor de coagulación	Enlazador	HLEP	Enlazador derivado de (que incluye modificaciones parcialmente)	SEQ ID NO:
	Enlazador con dos sitios de escisión			
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDVTQPERGDNNL TR IVGGQE	HSA	FIX, FX	79
FIX	SKL TR AETVFPDNNL TR IVGGQE	HSA	FIX, FX	80
FIX	RA ETVFPDVTQPERGDNNL TR IVGGQE	HSA	FIX FX	81
FIX	RA ETVFPERGDNNL TR IVGGQE	HSA	FIX FX	82
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPD VD YVNNL TR IVGGQE	HSA	FIX, FX	83
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPD D NNL TR IVGGQE	HSA	FIX, FX	84
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPD D NNL TR IVGGQE	HSA	FIX, FX	85
FIX	SVSQTSKL RA ETVFPD VD YVNSTE A ETILD NIT Q ST Q SFN DF TR V VG GEDA	HSA	FIX	86
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDV QSF ND DF TR V GGED	HSA	FIX	87
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDV SF ND DF TR V GGED	HSA	FIX	88
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDV N ASK PQGR IVGGKV	HSA	FIX y FVII	89
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDV N ASK PQGR LVGGKV	HSA	FIX y FVII	90
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPDV N ASK PQG RT VGGKV	HSA	FIX y FVII	91
FIX	SVSQTSKL TR AETVFPD D	Fc		92

5 Variantes y fragmentos de los enlazadores descritos están abarcadas también en la presente invención con tal que el enlazador pueda ser escindido todavía por la proteasa o las proteasas, que escinden los enlazadores de las tablas 3a y 3b o por el tipo de proteasas definido anteriormente. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, sean conservadoras o no-conservadoras.

10 Otras combinaciones de las secuencias de escisión arriba descritas y sus variantes pueden incluirse en la presente invención.

15 En otra realización, se incluyen sustituciones de aminoácidos que cambian el patrón de modificación del enlazador peptídico posterior a la traducción. Éstas pueden ser, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos que están glicosilados, sulfatados, o fosforilados.

20 En otra realización de la invención, el enlazador peptídico entre el polipéptido terapéutico y el resto HLEP contiene sitios de consenso para la adición de modificaciones posteriores a la traducción. Tales modificaciones están constituidas preferiblemente por sitios de glicosilación. Más preferiblemente, tales modificaciones están constituidas por al menos un sitio de glicosilación en N de la estructura Asn - X - Ser/Thr, donde X designa cualquier aminoácido excepto prolina. Aún más preferiblemente, tales sitios de glicosilación en N se insertan próximos al término amino y/o carboxi del enlazador peptídico de tal modo que los mismos son capaces de proteger neoepítos potenciales que podrían desarrollarse en las secuencias en las que el resto del polipéptido terapéutico está experimentando transición al enlazador peptídico.

Breve descripción de las Figuras

25 **Figura 1:** Activación in vitro de proteínas de fusión FIX-albúmina por FXIa a 37 °C para una relación molar de FXIa a proteína de fusión de aproximadamente 1:500. Se utilizaron una sola proteína de fusión con enlazador no-escindible (1478/797) y dos proteínas de fusión con enlazador escindible (1088/797 y 1089/797). Las muestras se analizaron por SDS/PAGE en condiciones reductoras seguido por tinción con azul Coomassie.

30 **Figura 2:** Farmacocinética de las proteínas de fusión rec FIX y FIX-albúmina activadas con y sin enlazador escindible comparadas con proteínas de fusión no activadas.

35 **Figura 3:** Desactivación de las proteínas de fusión rec FIX o FIX-albúmina activadas por AT. La actividad residual de FIX se determinó después de 120 minutos utilizando un ensayo de tiempo parcial de tromboplastina no-activado.

Ejemplos:**Ejemplo 1: Generación de cDNAs codificantes de proteínas de fusión FIX y FIX-albúmina**

5 La secuencia codificante de Factor IX se amplificó por PCR a partir de una biblioteca de cDNA de hígado humano (ProQuest, Invitrogen) utilizando los cebadores We1403 y We1404 (SEQ ID NO 5 y 6). Después de una segunda tanda de PCR utilizando los cebadores We1405 y We1406 (SEQ ID NO 7 y 8), el fragmento resultante se clonó en pCR4TOPO (Invitrogen). Desde éste, el cDNA FIX se transfirió como un fragmento EcoRI al sitio EcoRI de pRESpuro3 (BD Biosciences) en el que se había delecionado previamente un sitio XhoI interno. El plásmido resultante se designó pFIX-496 y fue el vector de expresión para el Factor IX tipo salvaje.

10 Para la generación de constructos de fusión de albúmina se reamplificó cDNA FIX por PCR en condiciones estándar utilizando los cebadores We2610 y We2611 (SEQ ID NO 9 y 10) delecionando el codón de parada e introduciendo un sitio XhoI en su lugar. El fragmento FIX resultante se digirió con las endonucleasas de restricción EcoRI y XhoI y se ligó a un pRESpuro3 digerido con EcoRI / BamHI junto con un fragmento enlazador digerido con XhoI / BamHI como se describe más adelante.

15 Se generaron dos fragmentos enlazadores glicina/serina sin sitios de escisión internos: los oligonucleótidos We2148 y We2150 (SEQ ID NO 11 y 12) se reasociaron en concentraciones equimolares (10 pmol) en condiciones estándar PCR, se rellenaron y se amplificaron utilizando un protocolo PCR de una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguida por 7 ciclos de desnaturalización durante 15 sec. a 94°C, 15 sec. de reasociación a 55°C y 15 sec. de elongación a 72°C, y finalizada por un paso de extensión de 5 min a 72°C. Se llevó a cabo el mismo procedimiento utilizando los oligonucleótidos We2156 y We2157 (SEQ ID NO 13 y 14). Los fragmentos enlazadores resultantes se digirieron con las endonucleasas de restricción XhoI y BamHI y se utilizaron por separado en la reacción de ligación descrita anteriormente. Los plásmidos resultantes contenían por tanto la secuencia codificante para FIX y una extensión C-terminal de un enlazador glicina/serina.

20 Se generaron dos fragmentos enlazadores escindibles diferentes derivados de los sitios de activación de FIX: los oligonucleótidos We2335 y We2336 (SEQ ID NO 15 y 16), que contenían el sitio de escisión de activación de la cadena ligera de FIX/región de borde del péptido de activación, se reasociaron, rellenaron, y amplificaron como se ha descrito arriba. El fragmento enlazador resultante se digirió con las endonucleasas de restricción XhoI y BamHI y se utilizó en la reacción de ligación descrita anteriormente. El plásmido resultante contenía por tanto la secuencia codificante para FIX y una extensión C-terminal de una secuencia FIX escindible (aminoácidos 136 a 154 de SEQ ID NO 2). En una reacción subsiguiente de mutagénesis orientada con un kit de mutagénesis disponible comercialmente (QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) utilizando los oligonucleótidos We2636 y We2637 (SEQ ID NO 17 y 18) se delecionó el sitio XhoI.

25 Para la generación del segundo fragmento enlazador escindible derivado de FIX, se llevó a cabo el mismo procedimiento utilizando los oligonucleótidos We2337 y We2338 (SEQ ID NO 19 y 20) para construcción de enlazadores. El fragmento enlazador resultante se digirió con las endonucleasas de restricción XhoI y BamHI y se utilizó en la reacción de ligación arriba descrita. El plásmido resultante contenía ahora la secuencia codificante para FIX y una extensión C-terminal de una secuencia FIX escindible derivada del sitio de escisión de activación del péptido de activación de FIX / región borde de la cadena pesada (aminoácidos 173 a 186 de SEQ ID NO 2). Para la deleción del sitio XhoI se utilizaron los oligonucleótidos We2638 y We2639 (SEQ ID NO 21 y 22) como se ha descrito arriba.

30 En el paso de clonación siguiente, los plásmidos generados anteriormente se digirieron con BamHI y se insertó un fragmento BamHI que contenía el cDNA de albúmina humana madura. Este fragmento había sido generado por PCR en una secuencia de cDNA de albúmina utilizando los cebadores We1862 y We1902 (SEQ ID NO 23 y 24) en condiciones estándar.

35 Los plásmidos finales con enlazadores glicina/serina no-escindibles se designaron pFIX-980 (SEQ ID NO 30) y pFIX-986 (SEQ ID NO 31), respectivamente. Los plásmidos finales con enlazadores escindibles derivados de las secuencias de FIX se designaron pFIX-1088 (SEQ ID NO 40) y pFIX-1089 (SEQ ID NO 49), respectivamente. Sus secuencias enlazadoras y las secuencias C-terminal de FIX y N-terminal de albúmina se reseñan a continuación. Los sitios de escisión proteolítica en los enlazadores se indican con flechas, y las secuencias enlazadoras derivadas de FIX están subrayadas.

o respectivamente FIX-albúmina se sometió a determinación de la actividad y antígeno de FIX conforme al ejemplo 5 y se caracterizó por investigaciones ulteriores in vitro e in vivo.

Ejemplo 5: Determinación de la actividad y el antígeno de FIX

La actividad de FIX se determinó como actividad de formación de coágulo o coagulación (FIX: C) utilizando reactivos de aPTT disponibles comercialmente (Pathromtin SL y plasma empobrecido en FIX, Dade Behring). Como referencia se utilizó un subestándar interno calibrado contra el estándar concentrado de FIX WHO International (96/854).

El antígeno de FIX (FIX:Ag) se determinó por un ensayo ELISA conforme a protocolos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Resumidamente, se incubaron placas de microtitulación con 100 µL por pocillo del anticuerpo de captura (anticuerpos apareados para FIX ELISA 1:200, Cedarlane, si bien pueden aplicarse también otras fuentes de anticuerpos apropiados) durante una noche a la temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces las placas con tampón de lavado B (Sigma P3563), se incubó cada pocillo con 200 µL de tampón de bloqueo C (Sigma P3688) durante una hora a la temperatura ambiente. Después de otros 3 pasos de lavado con tampón B, diluciones seriadas de la muestra de test en tampón B, así como diluciones seriadas de un subestándar (SHP) en tampón B (volúmenes por pocillo: 100 µL) se incubaron durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de 3 pasos de lavado con tampón B, se añadieron a cada pocillo 100 µL de una dilución 1:200 del anticuerpo de detección (anticuerpos apareados para FIX ELISA, marcados con peroxidasa, Cedarlane) en tampón B y se incubaron durante 2 horas más a la temperatura ambiente. Después de 3 pasos de lavado con tampón B, se añadieron 100 µL de solución sustrato (TMB, Dade Behring, OUVF) por pocillo y se incubaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µl de solución de parada sin diluir (Dade Behring, OSFA) preparó las muestras para lectura en un lector de microplacas adecuado a longitud de onda de 450 nm. Las concentraciones de las muestras de test se calcularon luego utilizando la curva estándar con plasma humano estándar como referencia.

Ejemplo 6: Comparación de la ratio actividad de FIX/antígeno de FIX de diferentes proteínas de fusión FIX-albúmina en el sobrenadante de cultivo de células

Sobrenadantes de cultivo celular de células HEK transfectadas con constructos de DNA que codificaban proteínas de fusión FIX-albúmina que contenían péptidos enlazadores diferentes se sometieron a tests de actividad y antígeno de FIX como se ha descrito arriba (véase ejemplo 5). Se calculó la ratio de FIX:C a FIX:Ag, que representaba una medida directamente proporcional a la actividad molar específica de los diferentes constructos.

Los resultados presentados en la Tabla 4 indican que se produce un aumento en la ratio actividad/antígeno después de la introducción de enlazadores escindibles en la molécula FIX-HSA. Se muestra también que el péptido enlazador escindible debería tener una longitud mayor que dos aminoácidos a fin de proporcionar ratios actividad/antígeno claramente aumentadas.

Tabla 4: Ratios FIX:C/FIX:Ag de proteínas de fusión FIX-albúmina que contienen péptidos enlazadores diferentes

Constructo FIX-HSA	Enlazador	FIX:C/ FIX:Ag	Número de veces de aumento comparado con la proteína de fusión 980/797 con enlazador no-escindible (GGGGGGV)
1182/797	Ninguno	<0,031	
1366/797	RI	< 0,068	
1478/863	GGGGGGV (Sheffield et al.)	0,041	--
980/797	SS(GGS) ₇ GS	0,070	1,7
986/797	SSNGS(GGS)3NGS (GGS)3GGNGS	0,076	1,9
1483/863	SVSQTSKLTR AETVFPDVD GSGGS	0,688	16,8
1088/797	SVSQTSKLTR AETVFPDVD GS	0,832	20,3
1365/797	SVSQTSKLTR AETVFPDVD	0,630	15,4
1482/863	SVSQTSKLTR AETVFP	0,482	11,8
1087/797	SVSQTSKLTR AETVFPDVD GS (FIX deltaKLT)	0,472	11,5
1089/797	QSFNDFTR VVGED GS	0,532	13,0
1091/797	PERGDNNLTR IVGGQE GS	0,111	2,7

Ejemplo 7: Comparación de las proteínas de fusión FIX y FIX-albúmina con respecto a actividad molar específica, semivida terminal in vivo y recuperación in vivo en ratas o conejos

Proteínas de fusión tipo salvaje recombinantes purificadas FIX (rFIX 496/797) y FIX-albúmina (rFIX 980/797, rFIX 986/797, rFIX- 1088/797 y rFIX 1089/797) se testaron respecto a actividad de FIX en un ensayo de formación de coágulo como se ha descrito arriba. En paralelo, se determinó la diferencia de densidad óptica a 280 y 320 nm como medida de la concentración de proteína (DO280-320). Se calcularon los ratios de actividad por DO280-320 y, basándose en las densidades ópticas molares, se calcularon las actividades molares específicas. En la Tabla 5 siguiente se resumen los resultados.

Tabla 5: Actividades molares específicas de FIX tipo salvaje comparada con las fusiones FIX-albúmina

	Enlazador	Densidad óptica (DO280-320)	Actividad de coagulación de FIX (UI/ml)	Actividad /Vol/DO (UI/mL/DO)	Actividad molar específica* (UI/nmol)
rFIX, tipo salvaje (496/797)	-	0,3798	21,2	55,8	4,23
rFIX-HSA (no-escindible, 1478/863)	GGGGGGV (Sheffield et al.)	2,9189	5,8	2,0	0,23
rFIX-HSA (no-escindible, 980/797)	SS (GGS) ₇ GS	1,1122	3,4	3,0	0,35
rFIX-HSA (no-escindible, 986/797)	SS NGS (GGS) ₃ NGS (GGS) ₃ GGN GS	0,8107	3,2	4,0	0,45
rFIX-HSA (escindible, 1088/797)	FXIa escindible	0,3421	11,9	34,8	3,95
rFIX-HSA (escindible, 1089/797)	FXIa escindible	0,4512	11,3	25,0	2,84

*Actividad molar específica basada en actividad, densidad óptica y las densidades ópticas molares siguientes: Densidad óptica molar de FIX: DO(280nm, 1 mol/L) = 75 810 Densidad óptica molar de albúmina: DO(280nm, 1 mol/L) = 37 791 Densidad óptica molar de la proteína de fusión FIX-albúmina: DO(280nm, 1 mol/L) = 113 601

Teniendo en cuenta los resultados resumidos en la Tabla 5, es sorprendente que dos constructos que se generaron de acuerdo con la presente descripción exhiben actividades molares específicas muy aumentadas comparados con las proteínas de fusión con enlazadores no-escindibles. Adicionalmente, la actividad molar específica de estos constructos era sólo moderadamente reducida comparada con rFIX tipo salvaje.

Investigaciones in vitro de las reacciones de escisión proteolítica por el Factor XIa (FXIa) confirmaron que las proteínas de fusión FIX-albúmina que contienen un enlazador escindible como v. g. el constructo No. 1088/797 ó 1089/797 están activadas y, en paralelo, el enlazador se escinde dando como resultado la liberación del resto albúmina (Fig. 1). La proteína de fusión con enlazador no-escindible no exhibía una liberación correspondiente del resto albúmina.

En el caso de FVIIa como proteasa de escisión en presencia de Factor tisular, las proteínas de fusión FIX-albúmina 1088/797 ó 1089/797 que contenían un enlazador escindible exhibían también liberación del resto albúmina en paralelo con la liberación del péptido de activación de FIX (datos no presentados).

Además de la determinación de la actividad molar específica de coagulación, los polipéptidos número 496/797, 980/797, 986/797, 1088/797 y 1089/797 descritos anteriormente se administraron por vía intravenosa a ratas CD / Lewis (6 ratas por sustancia) y/o conejos (4 conejos por sustancia) con una dosis de 50 UI/kg de peso corporal. Se extrajeron muestras de sangre antes de la administración de la sustancia de test y a intervalos apropiados comenzando a los 5 minutos después de la administración de las sustancias de test. El contenido de antígeno de FIX se cuantificó subsiguientemente por un ensayo ELISA específico para Factor IX humano (véase anteriormente). Los valores medios de los grupos respectivos se utilizaron para calcular la recuperación in vivo al cabo de 5 minutos. Se calcularon las semividas para cada proteína utilizando los valores puntuales de la fase beta de eliminación (semivida terminal) conforme a la fórmula $t_{1/2} = \ln 2/k$, en donde k es la pendiente de la línea de regresión obtenida representando los niveles FIX:Ag en escala logarítmica y el tiempo en escala lineal.

Las semividas in vivo calculadas se resumen en la Tabla 6. Se encontró que tanto en las ratas como en los conejos las semividas in vivo de las proteínas de fusión FIX-albúmina aumentaban significativamente en comparación con el FIX recombinante tipo salvaje no fusionado preparado en el laboratorio de los inventores o en comparación con el producto FIX recombinante disponible comercialmente BeneFIX®. Las semividas in vivo de las proteínas de fusión de albúmina comparadas con BeneFIX® se incrementaban a aproximadamente 200-400%, dependiendo de la especie animal o constructo utilizado (Tabla 6).

Para evaluar la recuperación in vivo, los niveles de antígeno de FIX medidos por ml de plasma a sus concentraciones máximas después de administración intravenosa (t = 5 min) estaban relacionados con la cantidad de producto aplicada por kg. Alternativamente, se calculó un porcentaje relacionando el nivel de antígeno determinado (UI/ml) 5 min después de la infusión con el nivel teórico de producto esperado para 100% de recuperación (producto aplicado por kg dividido por un volumen supuesto de plasma de 40 ml por kg). Las recuperaciones in vivo (IVR) de las proteínas de fusión FIX-albúmina eran significativamente mayores que las recuperaciones in vitro de rFIX (496/797) o BeneFIX® (Tabla 7).

Tabla 6:

Semividas in vivo terminales de preparaciones de FIX derivadas de proteínas de expresión recombinantes (BeneFIX®, rFIX 496/797) y proteínas de fusión FIX-albúmina (rFIX 980/797, rFIX 986/797, rFIX 1088/797, y rFIX 1089/797) después de administración intravenosa de 50 UI/kg en ratas y/o 50 UI/kg en conejos, respectivamente.				
	Experimentos en rata PSR18-05, PSR06-05, PSR02-05		Experimento en conejo PSK11-05	
	Semivida terminal (h)	con relación a BeneFIX [%]	Semivida terminal (h)	con relación a BeneFIX [%]
rFIX 496/797	4,5*	91	n. t.	n. t.
rFIX 980/797	11,6*	234	36,9° 29,3° (segundo exp.)	410 326
rFIX 986/797	10,5*	212	n. t.	n. t.
rFIX 1088/797	8,3*	168	30,3°	337
rFIX 1089/797	10,5*	212	n. t.	n. t.
BeneFIX	4,95* (valor medio de 5,3 y 4,6)	100	9,0°	100

* Determinado entre 120 y 1440 min
° Determinado entre 4 y 96 horas

Tabla 7:

Recuperaciones in vivo (cantidad de sustancia 5 min después de la administración) de preparaciones FIX recombinantes (BeneFIX, rFIX 496/797) y proteínas de fusión FIX-albúmina (rFIX 1088/797, rFIX 1089/797) después de administración intravenosa de 50 UI/kg en ratas. El porcentaje de recuperación in vivo se calculó basándose en un volumen supuesto de plasma de 40 ml/kg.		
	Experimento en rata	
	Recuperación in vivo UI/dL por UI/kg / [%]*	Con relación a BeneFIX [%]
rFIX 496/797	0,462/18,5	74,6
rFIX 1088/797	1,034/41,4	166,5
rFIX 1089/797	1,063/42,5	171,2
BeneFIX	0,621 /24,8	100

* Calculado sobre la base de un volumen de plasma de 40 mL/kg

Ejemplo 8: Activación in vitro de proteínas de fusión FIX-albúmina con/sin enlazador escindible (1088/797 y 980/797) y determinación de la farmacocinética en ratas

5 Proteínas de fusión FIX-albúmina y rec FIX se activaron in vitro utilizando Factor XIa disponible comercialmente (Kordia). Resumidamente, se activaron cantidades molares idénticas de proteína de fusión FIX o FIX-albúmina ($3,0 \times 10^{-6}$ moles/litro) a 37 °C en solución en presencia de FXIa ($1,9 \times 10^{-8}$ mol/litro) y CaCl_2 (1,5 mmol/litro) tamponada a pH 6,8. Después de activación completa como se mostró por SDS-PAGE, la reacción se paró por adición de un exceso molar 5 x de inhibidor C1 (Berinert P) basado en la cantidad de FXIa. Las muestras se guardaron congeladas por debajo de -70 °C hasta el comienzo de la investigación farmacocinética.

10 Se realizó una investigación farmacocinética de las proteínas de fusión FIX y FIX-albúmina activadas en ratas como se describe en el ejemplo 7 y los resultados se compararon con un resultado farmacocinético que abarcaba proteínas de fusión no activadas.

15 Se encontró que las proteínas de fusión activadas demostraban semividas, así como valores AUC significativamente reducidos comparadas con las moléculas no activadas (Figura 2). Después de la activación, la proteína de fusión FIX con enlazador escindible (1088/797) exhibía un comportamiento farmacocinético muy similar a rec FIX activada (BeneFIX), mientras que la proteína de fusión activada con enlazador no-escindible (980/797) daba como resultado una semivida mayor tanto inicial como terminal comparada con la proteína de fusión activada 1088/797 con enlazador escindible. Por tanto, los resultados demuestran claramente que el enlazador escindible da como resultado la eliminación aumentada del factor de coagulación después de la activación y, por consiguiente, evita la acumulación de proteínas de fusión activadas potencialmente trombógenas con semividas aumentadas.

Ejemplo 9: comparación de las proteínas de fusión FIX-albúmina con/sin enlazador escindible con respecto a la velocidad de desactivación de los factores de coagulación activados por antitrombina III (AT)

25 Se activaron proteínas de fusión FIX con (1088/797) y sin (980/797) enlazador escindible por incubación con FXIa como se describe en el ejemplo 8. Los factores activados se incubaron con AT durante 120 min y se determinó la actividad residual de FIXa utilizando un método manual de ensayo de coagulación de FIX sin activación (naPTT, véase más adelante) de acuerdo con Schnitger y Gross. Como muestras de control se utilizaron las proteínas de fusión FIX-albúmina activadas en presencia de la misma cantidad de AT, pero sin incubación.

30 Se determinó la actividad de FIX con ayuda de un ensayo de tiempo parcial de tromboplastina no-activado (naPTT) utilizando plasma deficiente en FIX de Dade Behring. Las muestras se diluyeron previamente en un tampón de pH 6,8 que contenía His, Gly, sacarosa, y Tween 80. La determinación completa se realizó utilizando coagulómetros de acuerdo con Schnitger & Gross. Una mezcla de 0,1 ml de plasma deficiente en FIX, 0,1 ml de muestra, y 0,1 ml de fosfolípidos al 0,1% (Rhone-Poulenc-Nattermann, prediluidos 1:3 en tampón de imidazol suplementado con 1% HSA) se incubó durante 2 minutos a 37 °C. La reacción de coagulación se inició por adición de 0,1 ml de solución de 0,025 mol/l CaCl_2 y se determinó el tiempo de coagulación.

35 La Figura 3 muestra los resultados de un experimento de desactivación correspondiente. En el caso de la proteína de fusión con enlazador escindible (1088/797) un aumento en el tiempo de coagulación desde 210 a 540 sec (Factor de 2,57x) demostró un proceso de desactivación acelerado de la actividad de FIXa por AT comparado con una proteína de fusión con enlazador no-escindible (980/797) que exhibía solamente un aumento desde 196 a 411 sec (Factor de 2,10x).
45 Muy probablemente, el residuo albúmina afecta estéricamente al proceso de desactivación dependiente de AT en el caso de la proteína de fusión con enlazador no-escindible, mientras que en el caso de la proteína de fusión con enlazador escindible el residuo albúmina se escinde dando como resultado una desactivación acelerada por AT.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CSL Behring GmbH CSL Behring GmbH
- 5 <120> Proteínas de fusión proteolíticamente escindibles con actividad molar específica alta
- <130> 2006_M004_A115
- 10 <150> EP06012262.9
<151> 2006-06-14
- <160> 112
- 15 <170> PatentIn version 3. 3
- <210> 1
<211> 585
<212> PRT
- 20 <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 729 426 T3

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

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

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

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser

ES 2 729 426 T3

180					185					190					
Ser	Ala	Lys 195	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys 200	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys 205	Phe	Gly	Glu
Arg	Ala 210	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala 215	Val	Ala	Arg	Leu	Ser 220	Gln	Arg	Phe	Pro
Lys 225	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu 230	Val	Ser	Lys	Leu	Val 235	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys 240
Val	His	Thr	Glu	Cys 245	Cys	His	Gly	Asp	Leu 250	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp 255	Asp
Arg	Ala	Asp	Leu 260	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys 265	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser 270	Ile	Ser
Ser	Lys	Leu 275	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu 280	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu 285	Lys	Ser	His
Cys	Ile 290	Ala	Glu	Val	Glu	Asn 295	Asp	Glu	Met	Pro	Ala 300	Asp	Leu	Pro	Ser
Leu 305	Ala	Ala	Asp	Phe	Val 310	Glu	Ser	Lys	Asp	Val 315	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala 320
Glu	Ala	Lys	Asp	Val 325	Phe	Leu	Gly	Met	Phe 330	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala 335	Arg
Arg	His	Pro	Asp 340	Tyr	Ser	Val	Val	Leu 345	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala 350	Lys	Thr
Tyr	Glu	Thr 355	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys 360	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp 365	Pro	His	Glu
Cys	Tyr 370	Ala	Lys	Val	Phe	Asp 375	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu 380	Val	Glu	Glu	Pro
Gln 385	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln 390	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe 395	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu 400
Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn 405	Ala	Leu	Leu	Val	Arg 410	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val 415	Pro
Gln	Val	Ser	Thr 420	Pro	Thr	Leu	Val	Glu 425	Val	Ser	Arg	Asn	Leu 430	Gly	Lys
Val	Gly	Ser 435	Lys	Cys	Cys	Lys	His 440	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg 445	Met	Pro	Cys
Ala	Glu 450	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val 455	Val	Leu	Asn	Gln	Leu 460	Cys	Val	Leu	His

ES 2 729 426 T3

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 2
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

5
10

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30

Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
35 40 45

Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65 70 75 80

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

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
100 105 110

ES 2 729 426 T3

Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
 115 125
 Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
 130 135 140
 Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 145 150 155 160
 Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
 165 170 175
 Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 180 185 190
 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 195 200 205
 Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 210 215 220
 Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 225 230 235 240
 Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 245 250 255
 His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 260 265 270
 Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 275 280 285
 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 290 295 300
 Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 305 310 315 320
 Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 325 330 335
 Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
 340 345 350
 Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 355 360 365
 His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
 370 375 380
 Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys

ES 2 729 426 T3

<400> 4

atgaagtggg taacctttat ttccttctt tttctcttta_ gctcggctta ttccaggggt	60
gtgtttcgtc gagatgcaca caagagtgag gttgctcatc ggtttaaaga tttgggagaa	120
gaaaatttca aagccttggt gttgattgcc tttgctcagt atcttcagca gtgtccattt	180
gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat	240
gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt cataccttt ttggagacaa attatgcaca	300
gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct	360
gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattggtg	420
agaccagagg ttgatgtgat gtgcactgct tttcatgaca atgaagagac atttttgaaa	480
aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ccttactttt atgccccgga actccttttc	540
tttgctaaaa ggtataaagc tgcttttaca gaatgttgcc aagctgctga taaagctgcc	600
tgctgtttgc caaagctcga tgaacttcgg gatgaagga aggcttcgtc tgccaaacag	660
agactcaagt gtgccagtct caaaaatth ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta	720
gctcgcctga gccagagatt tcccaaagct gagtttgag aagtttcaa gttagtgaca	780
gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac	840
aggggcgacc ttgccaaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag	900
gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa tcccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat	960
gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc	1020
aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc ctgggcagt ttttgatga atatgcaaga	1080
aggcatcctg attactctgt cgtgctgctg ctgagacttg ccaagacata tgaaaccact	1140
ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatcct catgaatgct atgccaaagt gttc gatgaa	1200
tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag	1260
cagcttgag agtacaatt ccagaatgag ctattagttc gttacaccaa gaaagtacc	1320
caagtgtcaa ctccaactct ttagagagtc tcaagaacc taggaaaagt gggcagcaaa	1380
tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg ccctgtgcag aagactatct atccgtggtc	1440
ctgaaccagt tatgtgtgtt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaatgc	1500
tgacacagaat ccttggtgaa caggcgacca tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca	1560
tacgttccca aagagttaa tgctgaaaca ttcaccttc atgcagatat atgcacactt	1620
tctgagaagg agagacaaat caagaaacaa actgcacttg ttgagctcgt gaaacacaag	1680
cccaaggcaa caaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc ttttgtagag	1740
aagtgtgca aggctgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttgtt	1800
5 gctgcaagtc aagctgcctt aggcttataa	1830

<210> 5

<211> 21

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Artificial

 <400> 5
 ccacttcac aatctgctag c 21

 10 <210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Artificial

 <400> 6
 20 caattcaat gaattaacct tgg 23

 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Artificial

 <400> 7
 30 atgcagcgcg tgaacatgat c 21

 <210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Artificial

 <400> 8
 40 tcattaagtg agctttggtt ttcc 25

 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Artificial

 <400> 9
 50 gattcgaatt cgcccttatg c 21

 <210> 10
 55 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Artificial

 <400> 10
 5 cgctcgaggt gagcttgtt tttcctaa tc 32

 <210> 11
 <211> 52
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Artificial

 <400> 11
 15 ctcgagcggg ggatctggcg ggtctggagg ctctggaggg tcgggaggct ct 52

 <210> 12
 <211> 46
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Artificial
 25
 <400> 12
 ggatccagat ccccagagc ctccagagcc tcccgaccct ccagag 46

 <210> 13
 30 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Artificial
 35
 <400> 13
 ctcgagcaat ggatctggcg ggtctggagg ctctggaggg tcgaatggct ctggag 56

 <210> 14
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 40

 <220>
 <223> Artificial
 45

 <400> 14
 50 ggatccgttc cctccagacc cgccagatcc cccagagcct ccagagccat tcgacctcc 60
 agag 64

 <210> 15
 <211> 46
 55 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60

ES 2 729 426 T3

<223> Artificial

<400> 15
5 cctcgagctc tgtgagccag acctccaagc tcaccagggc cgagac 46

<210> 16
<211> 44
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Artificial

<400> 16
15 gggatccgtc cacatcaggg aagacagtct cggccctggt gagc 44

<210> 17
<211> 33
<212> DNA
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Artificial

<400> 17
25 ggaaaaaaca aagctcactt ctgtgagcca gac 33

<210> 18
<211> 33
<212> DNA
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Artificial

<400> 18
35 gtctggctca cagaagtgag cttgttttt tcc 33

<210> 19
<211> 38
<212> DNA
40 <213> Secuencia Artificial

<220>
45 <223> Artificial

<400> 19
cctcgagcag agcttcaatg acttcacccg ggtggtgg 38

<210> 20
<211> 41
<212> DNA
50 <213> Secuencia Artificial

<220>
55 <223> Artificial

<400> 20
60

gggatccatc ctccccgcc accacccggg tgaagtcatt g 41

5 <210> 21
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Artificial

<400> 21
 ggaaaaaaca aagctcactc agagctcaa tgac 34

15 <210> 22
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Artificial

<400> 22
 gtcatgaag ctctgagtga gctttgttt ttcc 34

25 <210> 23
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Artificial

<400> 23
 gtgggatccg atgcacaca gagtgaggtt g 31

35 <210> 24
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Artificial

45 <400> 24
 cacggatccc tataagccta aggcagcttg acttg 35

50 <210> 25
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Artificial

55 <400> 25
 caaggagacg ggcgctcc 18

60 <210> 26

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Artificial

<400> 26
 gcccaaggag gggattggc 19

10 <210> 27
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Artificial

<400> 27
 20 gtggaattca tggagctgag gccctggtg 30

<210> 28
 <211> 38
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Artificial

<400> 28
 30 cacgcggcgc ctcactacag ccgttgcccc gcctccac 38

<210> 29
 <211> 704
 35 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 29
 40

ES 2 729 426 T3

Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn
20 25 30

Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val
35 40 45

Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr
50 55 60

Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His
65 70 75 80

Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu
85 90 95

Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu
100 105 110

Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
115 120 125

Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
130 135 140

His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
145 150 155 160

Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
165 170 175

Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
180 185 190

Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
195 200 205

Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val
210 215 220

ES 2 729 426 T3

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

ES 2 729 426 T3

Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
500 505 510

Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
515 520 525

Asn Asp Trp Ala Phe Thr Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
530 535 540

Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
545 550 555 560

Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
565 570 575

Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser
580 585 590

Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys
595 600 605

Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp
610 615 620

Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val
625 630 635 640

Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu
645 650 655

Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu
660 665 670

Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln
675 680 685

Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu
690 695 700

5

<210> 30
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Enlazador

15

<400> 30

ES 2 729 426 T3

Ser Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser
20 25

<210> 31

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

10 <400> 31

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

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

15

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Enlazador

<400> 32

25

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
1 5 10 15

Ala

30

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Enlazador

<400> 33

40

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser
1 5 10

45

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 729 426 T3

<220>
<223> Enlazador

<400> 34

5

Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
1 5 10 15

Ala

10 <210> 35
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Enlazador

<400> 35

20

Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Ser

25 <210> 36
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Enlazador

<400> 36

35

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

40 <210> 37
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Enlazador

<400> 37

50

ES 2 729 426 T3

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Gly Ser
20

5 <210> 38
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Enlazador

15 <400> 38

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

20 <210> 39
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Enlazador

<400> 39

30 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Gly Ser
20

35 <210> 40
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Enlazador

<400> 40

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Asn Gly Ser
20

<210> 41

50

ES 2 729 426 T3

<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial
5
<220>
<223> Enlazador
10
<400> 41
Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Gly Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15
Asp Val Asp
15
<210> 42
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial
20
<220>
<223> Enlazador
<400> 42
25
Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Thr Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15
Asp Val Asp
30
<210> 43
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial
35
<220>
<223> Enlazador
<400> 43
40
Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ser Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15
Asp Val Asp
45
<210> 44
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial
50
<220>
<223> Enlazador
<400> 44

ES 2 729 426 T3

Ser Val Ser Glu Thr Ser Lys Leu Thr Arg Leu Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

- 5 <210> 45
- <211> 19
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> Enlazador
- <400> 45

Ser Val Ser Glu Thr Ser Lys Leu Thr Arg Thr Glu Ala Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

- 15 <210> 46
- <211> 19
- <212> PRT
- 20 <213> Artificial
- <220>
- <223> Enlazador
- 25 <400> 46

Ser Val Ser Glu Thr Ser Lys Leu Thr Arg Gly Glu Ala Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

- 30 <210> 47
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 35 <223> Enlazador
- <400> 47

Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp
1 5 10

- 40 <210> 48
- <211> 14
- <212> PRT
- 45 <213> Artificial
- <220>
- <223> Enlazador

ES 2 729 426 T3

<400> 48

5 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
1 5 10

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

15 <400> 49

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Gly Ser
1 5 10 15

20 <210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Enlazador

<400> 50

30

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Thr Val Gly Gly Glu Asp
1 5 10

<210> 51

<211> 14

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

40

<400> 51

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Leu Val Gly Gly Glu Asp
1 5 10

45

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

50

<220>

<223> Enlazador

<400> 52

55

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Gly Val Gly Gly Glu Asp
1 5 10

<210> 53

60

ES 2 729 426 T3

<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial
5
<220>
<223> Enlazador
10
<400> 53
Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Asn Gly
1 5 10 15
Ser
15
<210> 54
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
20
<220>
<223> Enlazador
<400> 54
25
Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Asn
1 5 10 15
30
<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Enlazador
35
<400> 55
Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
1 5
40
<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
45
<220>
<223> Enlazador
<400> 56
50
Arg Leu Val Gly Gly Gln Glu
1 5
55
<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 729 426 T3

<220>
<223> Enlazador

5 <400> 57

Arg Thr Val Gly Gly Gln Glu
1 5

10 <210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Enlazador

<400> 58

20 Arg Val Val Gly Gly Gln Glu
1 5

25 <210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Enlazador

<400> 59

35 Arg Ala Val Gly Gly Gln Glu
1 5

40 <210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Enlazador

<400> 60

50 Arg Gly Val Gly Gly Gln Glu
1 5

55 <210> 61
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 61

ES 2 729 426 T3

Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 1 5 10 15

5 <210> 62
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 10 <400> 62

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15

15 Asp Val Asp
 <210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Enlazador
 25 <400> 63

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Asn
 1 5 10 15

30 <210> 64
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Enlazador
 <400> 64

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15

40 Asp Val Asp
 <210> 65
 <211> 16
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 50 <400> 65

ES 2 729 426 T3

Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val
 1 5 10 15

5 <210> 66
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Enlazador
 <400> 66

Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp
 1 5 10 15

15 <210> 67
 <211> 19
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Enlazador
 <400> 67

Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His
 1 5 10 15

30 Pro Lys Thr
 <210> 68
 <211> 20
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 40 <400> 68

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

Arg His Pro Ser
 20

45 <210> 69
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Enlazador
 <400> 69

ES 2 729 426 T3

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

His Tyr Phe Ile Ala
 20

5 <210> 70
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Enlazador
 <400> 70

Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln
 1 5 10 15

<210> 71
 <211> 24
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 25 <400> 71

Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp
 1 5 10 15

Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser
 20

<210> 72
 30 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Enlazador
 <400> 72

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

Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ala Ala Glu Glu Glu Asp
 20 25 30

<210> 73
 <211> 28
 <212> PRT
 45 <213> Artificial

ES 2 729 426 T3

<220>
<223> Enlazador

5 <400> 73

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

Arg His Pro Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala
20 25

10

<210> 74
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Enlazador

<400> 74

20

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

His Tyr Phe Ile Ala Ala
20

25

<210> 75
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

30

<220>
<223> Enlazador

<400> 75

Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln
1 5 10 15

Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
20 25 30

35

40

<210> 76
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

45

<220>
<223> Enlazador

<400> 76

ES 2 729 426 T3

Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys
1 5 10 15

Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala
20

5
<210> 77
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial
10
<220>
<223> Enlazador
15
<400> 77

Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His
1 5 10 15

Pro

20
<210> 78
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial
25
<220>
<223> Enlazador
30
<400> 78

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

Arg His Pro Ser
20

35
<210> 79
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial
40
<220>
<223> Enlazador
45
<400> 79

ES 2 729 426 T3

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15

Asp Val Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val
 20 25 30

Gly Gly Gln Glu
 35

- 5 <210> 80
- <211> 23
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Enlazador
- 15 <400> 80

Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Asn Asn Leu Thr
 1 5 10 15

Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 20

- 20 <210> 81
- <211> 27
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 25 <220>
- <223> Enlazador
- 30 <400> 81

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp
 1 5 10 15

Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 20 25

- 35 <210> 82
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 40 <220>
- <223> Enlazador
- 45 <400> 82

ES 2 729 426 T3

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg
 1 5 10 15

Ile Val Gly Gly Gln Glu
 20

5 <210> 83
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 83

15 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15

Asp Val Asp Tyr Val Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 20 25 30

20 <210> 84
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 84

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15

30 . . .

Asp Val Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 20 25 30

35 <210> 85
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 85

45 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15

Asp Val Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 20 25 30

ES 2 729 426 T3

<210> 86
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Enlazador

<400> 86

10

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn
 20 25 30
 Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly
 35 40 45
 Gly Glu Asp Ala
 50

15

<210> 87
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Enlazador

<400> 87

25

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
 20 25 30

30

<210> 88
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Enlazador

<400> 88

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Asp Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
 20 25 30

40

<210> 89

ES 2 729 426 T3

<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Enlazador

<400> 89

10 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val
20 25 30

<210> 90
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Enlazador

<400> 90

20 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

25 Asp Val Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Leu Val Gly Gly Lys Val
20 25 30

<210> 91
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Enlazador

<400> 91

35 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Thr Val Gly Gly Lys Val
20 25 30

40 <210> 92
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>

ES 2 729 426 T3

<223> Enlazador

<400> 92

5

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

<210> 93

10

<211> 666

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 93

15

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30

Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
35 40 45

Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65 70 75 80

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

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
100 105 110

Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
115 120 125

Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
130 135 140

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145 150 155 160

Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
165 170 175

ES 2 729 426 T3

Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 180 185 190
 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 195 200 205
 Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 210 215 220
 Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 225 230 235
 Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 245 250 255
 His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 260 265 270
 Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 275 280 285
 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 290 295 300
 Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 305 310 315 320
 Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 325 330 335
 Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
 340 345 350
 Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 355 360 365
 His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
 370 375 380
 Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
 385 390 395 400
 Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser
 405 410 415
 Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp
 420 425 430
 Val Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 435 440 445
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

ES 2 729 426 T3

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

- 5 <210> 94
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> Enlazador

- <400> 94

ES 2 729 426 T3

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val
1 5

5 <210> 95
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Enlazador

<400> 95

15 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Gly Ser Gly Gly Ser
20

20 <210> 96
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Enlazador

<400> 96

30 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val

35 <210> 97
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Enlazador

<400> 97

45 Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val
1 5 10 15

50 <210> 98
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

ES 2 729 426 T3

<400> 98

5 Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val
1 5 10

<210> 99

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

15 <400> 99

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

20

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Enlazador

<400> 100

30

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe
1 5 10 15

35

<210> 101

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Enlazador

<400> 101

45

Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe
1 5 10

50

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

55 <223> Enlazador

<400> 102

60

Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe
1 5 10

<210> 103

ES 2 729 426 T3

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 103
 10 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr
 1 5 10
 <210> 104
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 104
 20
 25 Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr
 1 5 10
 <210> 105
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 105
 35
 40 Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr
 1 5
 <210> 106
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 106
 50
 Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp
 1 5 10 15
 Gly Ser
 55 <210> 107
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 729 426 T3

<220>
 <223> Enlazador
 <400> 107
 5
 Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 108
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 108
 20
 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu
 1 5 10
 <210> 109
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 109
 30
 Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 1 5 10 15
 35
 Gly Ser
 <210> 110
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Enlazador
 45
 <400> 110
 50
 Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 <210> 111
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55
 <220>

ES 2 729 426 T3

<223> Enlazador

<400> 111

5 Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln
1 5 10

<210> 112

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Enlazador

<400> 112

20 Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly
1 5 10

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> CSL Behring GmbH CSL Behring GmbH
- <120> Proteínas de fusión proteolíticamente escindibles con actividad molar específica alta
- <130> 2006_M004_A115
- 10 <150> EP06012262. 9
- <151> 2006-06-14
- <160> 112
- 15 <170> PatentIn version 3. 3
- <210> 1
- <211> 585
- <212> PRT
- 20 <213> Homo sapiens
- <400> 1

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

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

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

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175

25 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser

ES 2 729 426 T3

			180						185					190	
Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu
		195					200					205			
Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro
	210					215					220				
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys
225					230					235					240
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp
				245					250					255	
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser
			260					265					270		
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His
		275					280					285			
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser
	290					295					300				
Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala
305					310					315					320
Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg
				325					330					335	
Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr
			340					345					350		
Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu
		355					360					365			
Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro
	370					375					380				
Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu
385					390					395					400
Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro
				405					410					415	
Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys
			420					425					430		
Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys
		435					440					445			
Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His
	450					455					460				

ES 2 729 426 T3

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585

5 <210> 2
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2

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

ES 2 729 426 T3

Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
 115 120 125
 Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
 130 135 140
 Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 145 150 155 160
 Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
 165 170 175
 Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 180 185 190
 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 195 200 205
 Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 210 215 220
 Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 225 230 235 240
 Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 245 250 255
 His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 260 265 270
 Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 275 280 285
 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 290 295 300
 Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 305 310 315 320
 Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 325 330 335
 Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
 340 345 350
 Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 355 360 365
 His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
 370 375 380
 Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys

ES 2 729 426 T3

<400> 4

5

atgaagtggg taacctttat ttcccttctt tttctcttta gctcggctta ttccaggggt 60
gtgtttcgtc gagatgcaca caagagtgag gttgctcatc ggtttaaaga tttgggagaa 120
gaaaatttca aagccttggg gttgattgcc tttgctcagt atcttcagca gtgtccattt 180
gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat 240
gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt catacccttt ttggagacaa attatgcaca 300
gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct 360
gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattggtg 420
agaccagagg ttgatgtgat gtgcaactgct tttcatgaca atgaagagac atttttgaaa 480
aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ccttactttt atgccccgga actccttttc 540
tttgctaaaa ggtataaagc tgcttttaca gaatgttgcc aagctgctga taaagctgcc 600
tgccgttgc caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag 660
agactcaagt gtgccagtct ccaaaaaattt ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta 720
gctcgcctga gccagagatt tcccaaagct gagtttgag aagtttcaa gttagtgaca 780
gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac 840
agggcggacc ttgccaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag 900
gaatgctgtg aaaaacctct gttgaaaaa tcccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat 960
gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc 1020
aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc ctgggcatgt ttttgatga atatgcaaga 1080
aggcatcctg attactctgt cgtgctgctg ctgagacttg ccaagacata tgaaacct 1140
ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatcct catgaatgct atgccaaagt gttcgatgaa 1200
tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag 1260
cagcttgag agtacaaatt ccagaatgct ctattagttc gttacaccaa gaaagtacc 1320
caagtgtcaa ctccaactct tntagaggct tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa 1380
tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg ccctgtgag aagactatct atccgtggtc 1440
ctgaaccagt tatgtgtggt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaatgc 1500
tgcacagaat ccttggtgaa caggcgacca tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca 1560
tacgttcca aagagttaa tgctgaaaca ttcacctcc atgcagatat atgcacactt 1620
tctgagaagg agagacaaat caagaaaca actgcacttg ttgagctcgt gaaacacaag 1680
ccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgagc ttttgtagag 1740
aagtgtgca aggctgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttgtt 1800
gctgcaagtc aagctgcctt aggcttataa 1830

10 <210> 5
<211> 21

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Artificial

 <400> 5
 ccacttcac aatctgctag c 21

 10 <210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Artificial

 <400> 6
 20 caattcaat gaattaacct tgg 23

 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Artificial

 <400> 7
 30 atgcagcgcg tgaacatgat c 21

 <210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Artificial

 <400> 8
 40 tcattaagtg agctttggtt ttcc 25

 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Artificial

 <400> 9
 50 gattcgaatt cgcccttatg c 21

 <210> 10
 55 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 729 426 T3

<220>
<223> Artificial

5 <400> 10
cgctcgaggt gagcttgtt tttcctaa tc 32

<210> 11
<211> 52
<212> DNA
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Artificial

15 <400> 11
ctcgagcggg ggatctggcg ggtctggagg ctctggaggg tcgggaggct ct 52

<210> 12
<211> 46
20 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Artificial

25 <400> 12
ggatccagat ccccagagc ctccagagcc tcccgaccct ccagag 46

<210> 13
<211> 56
30 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Artificial

35 <400> 13
ctcgagcaat ggatctggcg ggtctggagg ctctggaggg tcgaatggct ctggag 56

<210> 14
<211> 64
40 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Artificial

45 <400> 14
ggatccgttc cctccagacc cgccagatcc cccagagcct ccagagccat tcgacctcc 60

50 agag 64

<210> 15
<211> 46
55 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
60

<223> Artificial
 <400> 15
 5 cctcgagctc tgtgagccag acctccaagc tcaccagggc cgagac 46
 <210> 16
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Artificial
 <400> 16
 15 gggatccgtc cacatcaggg aagacagtct cggccctggt gagc 44
 <210> 17
 <211> 33
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 25 <400> 17
 ggaaaaaaca aagctcactt ctgtgagcca gac 33
 <210> 18
 <211> 33
 30 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> Artificial
 <400> 18
 gtctggctca cagaagtgag cttgttttt tcc 33
 <210> 19
 <211> 38
 40 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Artificial
 <400> 19
 50 cctcgagcag agcttcaatg acttcaccog ggtggtgg 38
 <210> 20
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Artificial
 <400> 20
 60

5 gggatccatc ctccccgcc accacccggg tgaagtcatt g 41
 <210> 21
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Artificial

 <400> 21
 ggaaaaaaca aagctcactc agagcttcaa tgac 34

 15 <210> 22
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Artificial

 <400> 22
 gtcattgaag ctctgagtga gctttgttt ttcc 34
 25 <210> 23
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Artificial

 <400> 23
 gtgggatccg atgcacacaa gagtgaggtt g 31
 35 <210> 24
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Artificial

 45 <400> 24
 cacggatccc tataagccta aggcagcttg acttg 35

 <210> 25
 <211> 18
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Artificial

 <400> 25
 caaggagacg ggcgctcc 18
 55 <210> 26
 60

<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> Artificial
<400> 26
10 gcccaaggag gggattggc 19
<210> 27
<211> 30
<212> DNA
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Artificial
20 <400> 27
gtggaattca tggagctgag gcctggtg 30
<210> 28
<211> 38
25 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Artificial
30 <400> 28
cacgggccg ctactacag ccgtgcccc gcctccac 38
<210> 29
35 <211> 704
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
40 <400> 29

ES 2 729 426 T3

Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn
20 25 30

Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val
35 40 45

Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr
50 55 60

Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His
65 70 75 80

Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu
85 90 95

Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu
100 105 110

Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
115 120 125

Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
130 135 140

His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
145 150 155 160

Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
165 170 175

Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
180 185 190

Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
195 200 205

Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val
210 215 220

ES 2 729 426 T3

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

ES 2 729 426 T3

Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
 500 505 510

Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
 515 520 525

Asn Asp Trp Ala Phe Thr Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
 530 535 540

Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
 545 550 555 560

Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
 565 570 575

Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser
 580 585 590

Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys
 595 600 605

Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp
 610 615 620

Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val
 625 630 635 640

Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu
 645 650 655

Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu
 660 665 670

Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln
 675 680 685

Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu
 690 695 700

- 5 <210> 30
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Enlazador
- <400> 30

ES 2 729 426 T3

Ser Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser
20 25

- 5 <210> 31
- <211> 31
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> Enlazador

- <400> 31

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

15 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Asn Gly Ser
20 25 30

- 20 <210> 32
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 25 <223> Enlazador

- <400> 32

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
1 5 10 15

30 Ala

- <210> 33
- <211> 14
- <212> PRT
- 35 <213> Artificial

- <220>
- <223> Enlazador

- 40 <400> 33

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser
1 5 10

- 45 <210> 34
- <211> 17
- <212> PRT
- 50 <213> Artificial

ES 2 729 426 T3

<220>
<223> Enlazador

<400> 34

5

Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
1 5 10 15

Ala

10 <210> 35
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Enlazador

<400> 35

20

Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Ser

25 <210> 36
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Enlazador

<400> 36

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

35

Asp Val Asp

40 <210> 37
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Enlazador

<400> 37

ES 2 729 426 T3

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Gly Ser
20

- 5 <210> 38
- <211> 19
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Enlazador
- <400> 38

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

- 20 <210> 39
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 25 <220>
- <223> Enlazador
- <400> 39

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Gly Ser
20

- 35 <210> 40
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 40 <220>
- <223> Enlazador
- <400> 40

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp Asn Gly Ser
20

- 45 <210> 41

ES 2 729 426 T3

<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Enlazador

10

<400> 41

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Gly Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

15

<210> 42
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> Enlazador

<400> 42

25

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Thr Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

30

<210> 43
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>
<223> Enlazador

40

<400> 43

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ser Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

45

<210> 44
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

50

<220>
<223> Enlazador

<400> 44

ES 2 729 426 T3

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Leu Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

5 <210> 45
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Enlazador

<400> 45

15 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Thr Glu Ala Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

20 <210> 46
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Enlazador

<400> 46

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Gly Glu Ala Val Phe Pro
1 5 10 15

30 Asp Val Asp

35 <210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Enlazador

<400> 47

Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp
1 5 10 15

45 <210> 48
<211> 14
<212> PRT
50 <213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

ES 2 729 426 T3

<400> 48

5 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
1 5 10

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

15 <400> 49

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Gly Ser
1 5 10 15

20

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Enlazador

<400> 50

30

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Thr Val Gly Gly Glu Asp
1 5 10

35

<210> 51

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Enlazador

<400> 51

45

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Leu Val Gly Gly Glu Asp
1 5 10

50

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

55 <223> Enlazador

<400> 52

60

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Gly Val Gly Gly Glu Asp
1 5 10

<210> 53

ES 2 729 426 T3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Enlazador

<400> 53

10

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Asn Gly
1 5 10 15

Ser

<210> 54

15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> Enlazador

<400> 54

25

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Asn
1 5 10 15

<210> 55

30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

35

<223> Enlazador

<400> 55

40

Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
1 5

<210> 56

45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 56

55

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

60

Arg Leu Val Gly Gly Gln Glu
1 5

ES 2 729 426 T3

<220>
<223> Enlazador

<400> 57
5

Arg Thr Val Gly Gly Gln Glu
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 58
20

Arg Val Val Gly Gly Gln Glu
1 5

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 59

Arg Ala Val Gly Gly Gln Glu
35 1 5

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 60

Arg Gly Val Gly Gly Gln Glu
50 1 5

<210> 61
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 61
60

ES 2 729 426 T3

Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
1 5 10 15

5 <210> 62
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Enlazador

<400> 62

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

15 Asp Val Asp

<210> 63
<211> 15
20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
25 <223> Enlazador

<400> 63

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Asn
1 5 10 15

30 <210> 64
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial
35 <220>
<223> Enlazador
40 <400> 64

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

<210> 65
45 <211> 16
<212> PRT
<213> Artificial
50 <220>
<223> Enlazador

<400> 65

55

ES 2 729 426 T3

Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val
 1 5 10 15

5 <210> 66
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 66

15 Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp
 1 5 10 15

20 <210> 67
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 67

Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His
 1 5 10 15

30 Pro Lys Thr

35 <210> 68
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 68

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

Arg His Pro Ser
 20

45 <210> 69
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 69

55

ES 2 729 426 T3

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

His Tyr Phe Ile Ala
 20

- 5 <210> 70
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Enlazador
- <400> 70

15 Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln
 1 5 10 15

- 20 <210> 71
- <211> 24
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 25 <220>
- <223> Enlazador
- <400> 71

Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp
 1 5 10 15

30 Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser
 20

- 35 <210> 72
- <211> 31
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 40 <220>
- <223> Enlazador
- <400> 72

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

45 Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ala Ala Glu Glu Glu Asp
 20 25 30

- 50 <210> 73
- <211> 28
- <212> PRT
- <213> Artificial

ES 2 729 426 T3

<220>
<223> Enlazador

<400> 73

5

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

Arg His Pro Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala
20 25

10 <210> 74
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Enlazador

<400> 74

20

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

His Tyr Phe Ile Ala Ala
20

25 <210> 75
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Enlazador

<400> 75

Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln
1 5 10 15

Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
20 25 30

35

40 <210> 76
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Enlazador

<400> 76

ES 2 729 426 T3

Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys
1 5 10 15

Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala
20

5

<210> 77

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

15

<400> 77

Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His
1 5 10 15

Pro

20

<210> 78

<211> 20

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

30

<400> 78

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

Arg His Pro Ser
20

35

<210> 79

<211> 36

40 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

45 <223> Enlazador

<400> 79

ES 2 729 426 T3

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val
20 25 30

Gly Gly Gln Glu
35

5

<210> 80

<211> 23

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

15 <400> 80

Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Asn Asn Leu Thr
1 5 10 15

Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
20

20

<210> 81

<211> 27

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

30 <400> 81

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp
1 5 10 15

Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
20 25

35

<210> 82

<211> 22

<212> PRT

40 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

45 <400> 82

ES 2 729 426 T3

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg
 1 5 10 15

Ile Val Gly Gly Gln Glu
 20

- 5 <210> 83
- <211> 32
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Enlazador
- <400> 83

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15

Asp Val Asp Tyr Val Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 20 25 30

- 20 <210> 84
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 25 <220>
- <223> Enlazador
- <400> 84

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15

Asp Val Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 20 25 30

- 35 <210> 85
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 40 <220>
- <223> Enlazador
- <400> 85

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15

Asp Val Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 20 25 30

ES 2 729 426 T3

<210> 86
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Enlazador

<400> 86

10

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn
 20 25 30
 Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly
 35 40 45
 Gly Glu Asp Ala
 50

15

<210> 87
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Enlazador

<400> 87

25

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
 20 25 30

30

<210> 88
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Enlazador

<400> 88

40

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Asp Val Asp Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
 20 25 30

45

<210> 89

ES 2 729 426 T3

<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Enlazador

<400> 89

10 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val
20 25 30

<210> 90
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
20 <223> Enlazador

<400> 90

25 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Leu Val Gly Gly Lys Val
20 25 30

<210> 91
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
35 <223> Enlazador

<400> 91

40 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Thr Val Gly Gly Lys Val
20 25 30

<210> 92
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>

ES 2 729 426 T3

<223> Enlazador

<400> 92

5

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

Asp Val Asp

10 <210> 93

<211> 666

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

15 <400> 93

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30

Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
35 40 45

Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65 70 75 80

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

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
100 105 110

Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
115 120 125

Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
130 135 140

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145 150 155 160

Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
165 170 175

ES 2 729 426 T3

Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 180 185 190
 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 195 200 205
 Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 210 215 220
 Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 225 230 235
 Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 245 250 255
 His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 260 265 270
 Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 275 280 285
 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 290 295 300
 Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 305 310 315 320
 Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 325 330 335
 Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
 340 345 350
 Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 355 360 365
 His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
 370 375 380
 Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
 385 390 395 400
 Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser
 405 410 415
 Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp
 420 425 430
 Val Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 435 440 445
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

ES 2 729 426 T3

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

- 5 <210> 94
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Enlazador

- <400> 94

- 15

ES 2 729 426 T3

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val
1 5

5 <210> 95
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Enlazador

<400> 95

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

15 Asp Val Asp Gly Ser Gly Gly Ser
20

20 <210> 96
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
25 <223> Enlazador

<400> 96

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

30 Asp Val

30 <210> 97
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> Enlazador

<400> 97
40

Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val
1 5 10 15

45 <210> 98
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
50 <223> Enlazador

ES 2 729 426 T3

<400> 98

5 Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val
1 5 10

<210> 99

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

15 <400> 99

20 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Enlazador

<400> 100

30

35 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe
1 5 10 15

<210> 101

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Enlazador

<400> 101

45

Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe
1 5 10

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

50

<220>

<223> Enlazador

<400> 102

55

60 Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe
1 5 10

<210> 103

ES 2 729 426 T3

<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Enlazador

<400> 103

10 Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr
1 5 10

<210> 104
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Enlazador

<400> 104

20

25 Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr
1 5 10

<210> 105
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Enlazador

<400> 105

35

40 Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr
1 5

<210> 106
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Enlazador

<400> 106

50 Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp
1 5 10 15

Gly Ser

55 <210> 107
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

60

ES 2 729 426 T3

<220>
<223> Enlazador

5 <400> 107

Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Gly Ser
1 5 10 15

10 <210> 108
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Enlazador

<400> 108

20 Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu
1 5 10

25 <210> 109
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Enlazador

<400> 109

Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
1 5 10 15

35 Gly Ser

40 <210> 110
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Enlazador

<400> 110

50 Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln
1 5 10 15

55 <210> 111
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

ES 2 729 426 T3

<223> Enlazador

<400> 111

5

Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln
1 5 10

10 <210> 112

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Enlazador

<400> 112

20

Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly
1 5 10

25

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión terapéutica que comprende
- 5 a) un factor de coagulación, o un fragmento del mismo,
 b) un polipéptido aumentador de la semivida seleccionado del grupo constituido por inmunoglobulinas sin dominios de fijación de antígeno, y
 c) un enlazador peptídico que une el factor de coagulación o fragmento del mismo y el polipéptido aumentador de la semivida;
- 10 en donde el enlazador peptídico puede ser escindido por proteasas implicadas en la coagulación o activadas por enzimas de la coagulación y en el que la proteína de fusión terapéutica tiene, en comparación con la proteína de fusión terapéutica respectiva enlazada por un enlazador no-escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGV:
- 15 (i) una actividad molar específica aumentada en al menos un ensayo relacionado con la coagulación; y
 (ii) una velocidad de eliminación aumentada del factor de coagulación activado después que el enlazador peptídico es escindido proteolíticamente en un modo relacionado con la coagulación.
- 20 2. Proteína de fusión terapéutica conforme a la reivindicación 1 en donde dicha proteína de fusión tiene una mayor recuperación in vivo comparada con la recuperación in vivo del factor de coagulación respectivo que no está fusionado a un polipéptido aumentador de la semivida.
- 25 3. Proteína de fusión terapéutica conforme a las reivindicaciones 1 y 2 en donde dicha proteína de fusión tiene una semivida en plasma aumentada comparada con la semivida en plasma del factor de coagulación respectivo que no está fusionado a un polipéptido aumentador de la semivida.
- 30 4. Proteína de fusión terapéutica conforme a las reivindicaciones 1 a 3 en donde el factor de coagulación se selecciona de la lista constituida por Factor IX, Factor VII, Factor VIII, Factor von Willebrand, Factor V, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, Factor I, Factor II (Protrombina), Proteína C, Proteína S, GAS6, y Proteína Z.
5. Proteína de fusión terapéutica conforme a las reivindicaciones 1 a 4 en donde el factor de coagulación es un factor de coagulación dependiente de vitamina K, tal como FVIIa o FIX.
- 35 6. Proteína de fusión terapéutica conforme a las reivindicaciones 1 a 5 en donde el enlazador es escindible por FXIa y/o FVIIa/TF.
- 40 7. Proteína de fusión terapéutica conforme a las reivindicaciones 1 a 6, en donde la actividad molar específica relacionada con la coagulación de la proteína de fusión terapéutica está aumentada al menos 25% comparada con la de la proteína de fusión terapéutica enlazada por un enlazador no-escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGV en al menos uno de los diferentes ensayos relacionados con la coagulación disponibles.
- 45 8. Proteína de fusión terapéutica conforme a las reivindicaciones 1 a 7, en donde la velocidad de desactivación del factor de coagulación después de la escisión del enlazador peptídico que enlaza el factor de coagulación con el polipéptido aumentador de la semivida está aumentada en al menos 10% comparada con la velocidad de desactivación del factor de coagulación en una fusión terapéutica correspondiente enlazada por un enlazador no-escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGV.
- 50 9. Proteína de fusión terapéutica conforme a las reivindicaciones 1 a 8, en donde la velocidad de eliminación del factor de coagulación después de la escisión del enlazador peptídico que enlaza el factor de coagulación con el polipéptido aumentador de la semivida está aumentada en al menos 10% comparada con la velocidad de eliminación del factor de coagulación en una proteína de fusión terapéutica enlazada por un enlazador no-escindible que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGGV.
- 55 10. Proteína de fusión terapéutica conforme a las reivindicaciones 1 a 9, en donde el enlazador es escindible por la proteasa o proteasas, que activa(n) el factor de coagulación.
- 60 11. Proteína de fusión terapéutica conforme a las reivindicaciones 1 a 10, en donde el enlazador es escindible por la proteasa o proteasas que se activan por la implicación del factor de coagulación.
12. Proteína de fusión terapéutica conforme a las reivindicaciones 1 a 11, en donde el enlazador es escindible por FXIa y/o por FVIIa/TF y el factor de coagulación es FIX.
- 65 13. Proteína de fusión terapéutica conforme a las reivindicaciones 1 a 11, en donde el enlazador es escindible por FXIa y/o por FVIIa/TF, y el factor de coagulación es FVIIa.

14. Proteína de fusión terapéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el enlazador comprende una secuencia seleccionada del grupo de tablas 3a y 3b.
- 5 15. Proteína de fusión terapéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso como medicamento.
16. Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión terapéutica conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 10 17. Un plásmido o vector que comprende un ácido nucleico conforme a la reivindicación 16.
18. Un plásmido o vector conforme a la reivindicación 17, que es un vector de expresión.
- 15 19. Una célula hospedadora que comprende un polinucleótido conforme a la reivindicación 16 o un plásmido o vector conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18.
- 20 20. Un método de producción de una proteína de fusión terapéutica conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende cultivar células hospedadoras conforme a la reivindicación 19 en condiciones tales que se expresa la proteína de fusión terapéutica.
21. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión terapéutica conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, un polinucleótido conforme a la reivindicación 16, o un plásmido o vector conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 18.
- 25 22. Una proteína de fusión terapéutica conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno de la coagulación de la sangre.
- 30 23. La proteína de fusión terapéutica para uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno de la coagulación de la sangre conforme a la reivindicación 22, en donde el trastorno de la coagulación de la sangre es (a) hemofilia B, (b) deficiencia de FVII y/o FVIIa o (c) hemofilia A.





