

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 933**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2016 PCT/EP2016/054647**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16142288**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2016 E 16712738 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3265483**

54 Título: **Factor de von Willebrand modificado que tiene una semivida mejorada**

30 Prioridad:

06.03.2015 EP 15158065

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

08.07.2020

73 Titular/es:

**CSL BEHRING LENGNAU AG (100.0%)
Industriestrasse 11
2543 Lengnau BE, CH**

72 Inventor/es:

**MOSES, MICHAEL;
SCHULTE, STEFAN;
DICKNEITE, GERHARD;
KALINA, UWE;
PESTEL, SABINE y
WEIMER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 772 933 T3

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

DESCRIPCIÓN

Factor de von Willebrand modificado que tiene una semivida mejorada

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a productos y procedimientos para mejorar el tratamiento de trastornos de la coagulación sanguínea.

Antecedentes de la invención

Existen diversos trastornos de sangrado causados por deficiencias de factores de coagulación sanguínea. Los trastornos más comunes son la hemofilia A y B, que resultan de deficiencias del factor de coagulación sanguínea VIII (FVIII) y IX, respectivamente. Otro trastorno de sangrado conocido es la enfermedad de von Willebrand (VWD).

10 En el plasma, el FVIII existe principalmente como un complejo no covalente con el factor de von Willebrand (VWF), y su función coagulante es acelerar la conversión dependiente del factor IXa del factor X a Xa.

15 La hemofilia o hemofilia A clásica es un trastorno de sangrado hereditario. Es el resultado de una deficiencia ligada al cromosoma X de la coagulación de la sangre FVIII, y afecta casi exclusivamente a hombres con una incidencia de entre uno y dos individuos por cada 10.000. El defecto del cromosoma X es transmitido por portadoras femeninas que no son hemofílicas en sí mismas. La manifestación clínica de la hemofilia A es una mayor tendencia al sangrado.

20 En pacientes con hemofilia A grave sometidos a tratamiento profiláctico, el FVIII debe administrarse por vía intravenosa (i.v.) aproximadamente 3 veces por semana debido a la corta semivida plasmática del FVIII de aproximadamente 12 a 14 horas. Cada administración i.v. es engorrosa, asociada con dolor y conlleva el riesgo de una infección, especialmente porque se hace principalmente en casa por los propios pacientes o por los padres de los niños diagnosticados con hemofilia A.

Por lo tanto, sería altamente deseable aumentar la semivida de FVIII de modo que las composiciones farmacéuticas que contienen FVIII tengan que administrarse con menos frecuencia.

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

30 Otra metodología para mejorar la semivida funcional de FVIII o VWF es por PEGilación de FVIII (WO 2007/126808, WO 2006/053299, WO 2004/075923) o por PEGilación de VWF (WO 2006/071801), VWF pegilado que al tener una semivida aumentada indirectamente también mejoraría la semivida del FVIII presente en el plasma. También se han descrito proteínas de fusión de FVIII (WO 2004/101740, WO2008/077616 y WO 2009/156137).

35 El VWF, que está ausente, tiene un defecto funcional, o solo está disponible en cantidad reducida en diferentes formas de la enfermedad de von Willebrand (VWD), es una glucoproteína adhesiva multimérica presente en el plasma de mamíferos, que tiene múltiples funciones fisiológicas. Durante la hemostasia primaria, el VWF actúa como mediador entre los receptores específicos en la superficie de las plaquetas y los componentes de la matriz extracelular, como el colágeno. Además, el VWF sirve como vehículo y proteína estabilizadora para el procoagulante FVIII. El VWF se sintetiza en células endoteliales y megacariocitos como una molécula precursora de 2813 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADNc de VWF de tipo salvaje están descritas en Collins et al. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 84: 4393-4397. El polipéptido precursor, pre-pro-VWF, consiste en un péptido de señalización de 22 residuos, un propéptido de 741 residuos y el polipéptido de 2050 residuos que se encuentra en plasma maduro VWF (Fischer et al., FEBS Lett. 351: 345-348, 1994). Después de la escisión del péptido de señalización en el retículo endoplasmático, se forma un puente disulfuro C-terminal entre dos monómeros de VWF. Durante el transporte posterior a través de la vía secretora, se agregan 13 cadenas laterales de carbohidratos unidas a N y 10 O (Canis et al. (2010) Journal of Thrombosis and Haemostasis, 8: 137-145; Canis et al. (2012) The Biochemical Journal, 447: 217-228). Más importante aún, los dímeros de VWF se multimerizan a través de puentes disulfuro N-terminales y el propéptido de 741 aminoácidos de longitud es escindido por la enzima PACE/furina en el aparato de Golgi tardío. El propéptido, así como los multímeros de alto peso molecular de VWF (VWF-HMWM) se almacenan en los cuerpos Weibel-Palade de células endoteliales o en los gránulos α de las plaquetas.

50 Una vez secretada en plasma, la proteasa ADAMTS13 escinde el VWF dentro del dominio A1 de VWF. Por lo tanto, el VWF en plasma consiste en una gama completa de multímeros que van desde dímeros individuales de 500 kDa a multímeros que consisten en más de 20 dímeros de un peso molecular de más de 10.000 kDa. El VWF-HMWM tiene la actividad hemostática más fuerte, que se puede medir en la actividad del cofactor de ristocetina (VWF:RCo). Cuanto mayor sea la proporción de antígeno VWF:RCo/VWF, mayor será la cantidad relativa de multímeros de alto peso molecular.

55

Los defectos en el VWF son causales de la enfermedad de von Willebrand (VWD), que se caracteriza por un fenotipo de sangrado más o menos pronunciado. La VWD tipo 3 es la forma más grave en la que falta completamente el VWF, la VWD tipo 1 se relaciona con una pérdida cuantitativa de VWF y su fenotipo puede ser muy leve. La VWD tipo 2 se relaciona con defectos cualitativos de VWF y puede ser tan grave como la VWD tipo 3. La VWD tipo 2 tiene muchas subformas, algunas de ellas asociadas con la pérdida o la disminución de multímeros de alto peso molecular. La VWD tipo 2a se caracteriza por una pérdida de multímeros intermedios y grandes. La VWD tipo 2B se caracteriza por una pérdida de multímeros de mayor peso molecular.

La VWD es el trastorno de sangrado hereditario más frecuente en humanos y puede tratarse mediante terapia de reemplazo con concentrados que contienen VWF de origen plasmático o recombinante.

En el plasma, el FVIII se une con alta afinidad al VWF, lo que lo protege del catabolismo prematuro y, por lo tanto, juega además de su papel en la hemostasia primaria, un papel crucial para regular los niveles plasmáticos de FVIII y, como consecuencia, también es un factor central para controlar la hemostasia secundaria. La semivida del FVIII no activado unido al VWF es de aproximadamente 12 a 14 horas en plasma. En la enfermedad de von Willebrand tipo 3, donde no está presente o casi no hay VWF, la semivida del FVIII es de aproximadamente 6 horas, lo que lleva a síntomas de hemofilia A leve a moderada en tales pacientes debido a la disminución de las concentraciones de FVIII. El efecto estabilizador de VWF sobre FVIII también se ha utilizado para ayudar a la expresión recombinante de FVIII en células CHO (Kaufman et al. 1989, Mol Cell Biol).

Según Badirou et al. (2012), "*In vivo* analysis of the role of O-Glycosylations of von Willebrand Factor", PLoS ONE, 7(5): e37508, se muestran ciertas variantes de VWF murino que tienen nueve sitios de glucosilación mutados. Estas construcciones mutantes de VWF se analizaron con respecto al impacto de la O-glucosilación perdida. Entre otros, se ha mostrado un mutante VWF murino T2298A. Sin embargo, no hay ninguna enseñanza en esta referencia para su uso estos mutantes en un tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre en lugar de usar VWF de tipo salvaje. No se mostraron ni sugirieron mejoras en la eliminación *in vivo* en comparación con el VWF derivado de plasma nativo para dichas variantes de VWF. Sin embargo, para algunas de las variantes de VWF descritas en Badirou et al., se observó una reducción en la semivida.

El documento WO 2013/167303 A1 se refiere a un intento de reducir la eliminación de VWF buscando un aumento concomitante en la semivida del FVIII. Esta referencia sugiere usar una composición que comprende un azúcar aislado que tiene un residuo de azúcar accesible derivado del antígeno del grupo sanguíneo ABO(H) para reducir la eliminación *in vivo* de VWF.

Se necesitan productos y procedimientos para aumentar la semivida de VWF, FVIII o ambos factores.

Sumario de la invención

En una invención separada, se descubrió que los monómeros de VWF se unen fuertemente al miembro A de la familia 10 del dominio de lectina de tipo calcio (CLEC10A), una proteína receptora presente en los macrófagos. En particular, se podría demostrar que CLEC10A juega un papel crucial en la eliminación de VWF. En la presente invención, se descubrió además que el sitio 2298 de glicano unido a O presente en VWF interactúa con CLEC10A. Por lo tanto, la presente invención proporciona moléculas de VWF modificadas como se define de acuerdo con la reivindicación 1 que carece de la glucosilación ligada a O en la posición 2298 para prolongar la semivida de las moléculas de VWF *in vivo*.

La presente invención, por lo tanto, se refiere a la materia definida en los puntos [1] a [18]:

[1] Una molécula de factor de von Willebrand (VWF) humano capaz de unirse al Factor VIII, que comprende un dominio C1 que carece de un sitio de O-glicosilación en la posición de aminoácido 2298 para su uso en el tratamiento de un trastorno de la coagulación sanguínea, en donde dicho trastorno de coagulación sanguínea es la hemofilia A o la enfermedad de von Willebrand y teniendo la molécula de VWF una eliminación reducida *in vivo* en comparación con el VWF derivado de plasma nativo. Preferiblemente, la molécula de VWF no es murina.

[2] La molécula de VWF para su uso del ítem [1], en donde el sitio de O-glicosilación en la posición 2298 presente en el VWF nativo se ha inactivado eliminando o sustituyendo uno o más aminoácidos en las posiciones 2292 a 2303 de la secuencia de aminoácidos del VWF .

[3] La molécula de VWF para su uso del ítem [2], en la que la treonina en la posición 2298 se ha eliminado o sustituido con un aminoácido distinto de la treonina y la serina.

[4] La molécula de VWF para su uso del ítem [3], en donde dicho aminoácido que no sea treonina y serina se selecciona del grupo que consiste en glicina, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina.

[5] La molécula de VWF para su uso de uno cualquiera de los elementos anteriores, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 10 u 11.

[6] La molécula de VWF para su uso del ítem [2], en la que la prolina en una de las posiciones 2295, 2297 y 2302 se ha eliminado o sustituido con un aminoácido diferente.

5 [7] Además se describe en el presente documento un dominio VWF C1 que comprende el sitio de O-glicosilación en la posición de aminoácido 2298, unido a una unidad estructural que prolonga la semivida, preferiblemente fusionado a la albúmina humana.

[8] La molécula de VWF para su uso de uno cualquiera de los ítems [1]-[6], que es capaz de aumentar la semivida del Factor VIII coadministrado con dicha molécula de VWF, en comparación con la semivida del Factor VIII coadministrado con VWF derivado de plasma nativo.

10 [9] La molécula de VWF para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los ítems [1] a [6] o del ítem [8], en donde dicho tratamiento comprende además administrar una molécula de Factor VIII.

[10] La molécula de VWF para su uso de acuerdo con el ítem [9], en donde dicha molécula de VWF y dicha molécula de Factor VIII se administran por separado.

[11] Una composición farmacéutica que comprende la molécula de VWF de cualquiera de los ítems [1] a [6] o el ítem [8].

15 [12] Un kit farmacéutico que comprende (i) la molécula de VWF de uno cualquiera de los ítems [1] a [6] o el ítem [8] y (ii) una molécula de Factor VIII.

[13] El kit farmacéutico del ítem [12], en el que dicha molécula de VWF y dicha molécula de Factor VIII están contenidas en composiciones separadas.

20 [14] Un kit farmacéutico que comprende (i) la molécula de VWF de uno cualquiera de los ítems [1] a [6] o el ítem [8] y (ii) una molécula de Factor VIII, para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre

[15] La molécula de VWF para su uso de uno cualquiera de los ítems [1] a [6] u ítem [8], en donde la semivida del Factor VIII aumenta *in vivo*.

25 [16] La molécula de VWF para su uso como se define en uno cualquiera de los ítems [1] a [6] o ítem [8], en donde la semivida del Factor VIII se prolonga en un tratamiento terapéutico.

[17] En el presente documento se describe un procedimiento para aumentar la semivida del Factor VIII *in vivo*, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de la molécula de VWF de uno cualquiera de los ítems [1] a [6].

30 [18] En el presente documento se describe un procedimiento de tratamiento de un trastorno de coagulación de la sangre, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de la molécula de VWF de uno cualquiera de los ítems [1] a [6].

Descripción de los dibujos

35 **Figura 1: Estructuras de dominio, sitios de unión funcionales y posiciones de glucano del monómero VWF maduro.** La estructura proteica del monómero VWF revela áreas de homología interna denominadas dominios A, C y D. VWF interactúa con una gran cantidad de ligandos con una variedad de funciones biológicas. Cada monómero VWF maduro contiene 13 sitios de glicosilación unidos a N (flechas hacia arriba) y 10 unidos a O (flechas hacia abajo) distribuidos como se muestra. Se da el número de secuencia del aminoácido involucrado en un enlace glucosídico. La anotación revisada de la estructura de subunidades maduras de VWF fue adaptada y modificada a partir de Zhou et al. (2012) Blood 120(2): 449-458.

40 **Figura 2: O-glucanos predominantes detectados en fracciones de eluato después de incubar fragmentos trípticos de VWF con CLEC10A soluble**

(NeuGc = ácido N-glicolilneuramínico; GlcNAc = N-acetilglucosamina; Gal = galactosa; GalNAc = N-acetilgalactosamina)

45 El glicano del núcleo 2 (A), el glicano del núcleo 1 que porta un residuo NeuGc (B) y el glicano del núcleo 2 alargado con el disacárido GlcNAc β 1,3Gal (C) se identificaron como estructuras predominantes de O-glicano presentes en las fracciones de eluato. Después de la incubación de fragmentos trípticos de VWF con CLEC10A soluble, lavado y elución de péptidos de VWF unidos, los análisis MALDI-TOF-MS de glucanos libres revelaron un enriquecimiento significativo de la estructura de glucano A (factor de concentración de >40), B (factor 9) y C (factor 7), cuando se compara con el material de partida antes de la incubación con CLEC10A. Los tres O-glucanos mostrados representaban aproximadamente el 80 % de todas las estructuras de O-glucano detectadas (40 % relacionado con la estructura B, mientras que A y C representaban el 20 % cada una).

50

Descripción detallada

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula modificada del factor de von Willebrand (VWF) capaz de unirse al Factor VIII, que comprende un dominio C1 que carece de un sitio de O-glicosilación en la posición de aminoácido 2298 como se define adicionalmente de acuerdo con la reivindicación 1.

5 **VWF**

El término "factor de von Willebrand" (VWF) tal como se usa en el presente documento incluye VWF natural (nativo), pero también variantes del mismo, por ejemplo, fragmentos, proteínas de fusión o conjugados, o variantes de secuencia donde se han insertado, eliminado o sustituido uno o más residuos, reteniendo la actividad biológica del VWF natural. La actividad biológica se retiene en el sentido de la invención si la variante de VWF retiene al menos 10 %, preferiblemente al menos 25 %, más preferiblemente al menos 50 %, lo más preferiblemente al menos 75 % de al menos una de las actividades biológicas de VWF tipo salvaje. El artesano puede determinar la actividad biológica del VWF de tipo salvaje y sus variantes utilizando procedimientos para la actividad del cofactor de ristocetina (Federici A B et al. 2004. Haematologica 89: 77-85), unión de VWF a GP Iba del complejo plaqueta glucoproteína Ib-V-IX (Sucker et al. 2006. Clin Appl Thromb Hemost. 12: 305-310), o un ensayo de unión a colágeno (Kallas & Talpsep. 2001. Annals of Hematology 80: 466-471)), o un ensayo de unión al Factor VIII (Veyradier et al. (2011) Haemophilia, vol. 17, págs. 944-951).

El gen que codifica el VWF nativo humano se transcribe en un ARNm de 9 kb que se traduce en un prepolipéptido de 2813 aminoácidos con un peso molecular estimado de 310.000 Da. El prepolipéptido contiene un péptido de señalización de 22 aminoácidos, un polipéptido de 741 aminoácidos (aminoácidos 23-763 de SEQ ID NO: 2) y la subunidad madura (aminoácidos 764-2813 de SEQ ID NO: 2). La escisión del polipéptido de 741 aminoácidos del N-terminal da como resultado un VWF maduro que consiste en 2050 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos del prepolipéptido VWF nativo humano se muestra en SEQ ID NO: 2. A menos que se indique lo contrario, la numeración de aminoácidos de los residuos de VWF en esta solicitud se refiere a SEQ ID NO: 2, incluso si la molécula de VWF no comprende todos los residuos de SEQ ID NO: 2. El término "VWF" como se usa en el presente documento se refiere a la forma madura de VWF a menos que se indique lo contrario.

El prepolipéptido del VWF nativo comprende múltiples dominios. Se pueden encontrar diferentes anotaciones de dominio en la literatura (véase, por ejemplo, Zhou et al. (2012) Blood 120(2): 449-458). La siguiente anotación de dominio del prepolipéptido nativo de VWF se aplica en esta solicitud (véase también la Figura 1):

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

30 Con referencia a la SEQ ID NO: 2, el dominio D' consiste en los aminoácidos 764-865; el dominio D3 consiste en los aminoácidos 866-1242; y el dominio C1 consiste en los aminoácidos 2255-2328.

Una molécula de VWF "modificada" tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos del VWF nativo humano maduro (aminoácidos 764-2813 del aminoácido que se muestra en la SEQ ID NO: 2).

35 La molécula de VWF modificada de la presente invención comprende un dominio C1 de VWF que carece de un sitio de O-glicosilación en la posición de aminoácido 2298. La secuencia de aminoácidos del dominio C1 comprendida en la molécula de VWF modificada de la invención tiene una identidad de secuencia a los aminoácidos 2255-2328 de SEQ ID NO: 2 de al menos 80 %, preferiblemente de al menos 85 %, más preferiblemente de al menos 90 %, lo más preferiblemente de al menos 95 %.

40 En las realizaciones preferentes, uno, dos o tres (pero no más) aminoácidos que están presentes en los aminoácidos 2255-2328 de la SEQ ID NO: 2 se eliminan y/o sustituyen en el dominio C1 comprendido en la molécula de VWF modificada de la presente invención.

45 En una primera realización, la molécula de VWF modificada de la presente invención comprende los aminoácidos 2255-2328 de la SEQ ID NO: 2 excepto por tres aminoácidos, en la que cada uno de dichos tres aminoácidos ha sido eliminado o sustituido con un aminoácido no presente en la posición respectiva dentro de SEQ ID NO: 2. Es decir, la secuencia de aminoácidos del dominio C1 de la molécula de VWF modificada de la invención difiere de la secuencia de aminoácidos del dominio C1 de la SEQ ID NO: 2 en tres (y no más) aminoácidos.

50 En una segunda realización, la molécula de VWF modificada de la presente invención comprende los aminoácidos 2255-2328 de la SEQ ID NO: 2, excepto dos aminoácidos, en la que cada uno de dichos dos aminoácidos ha sido eliminado o sustituido con un aminoácido no presente en la posición respectiva dentro de SEQ ID NO: 2. Es decir, la secuencia de aminoácidos del dominio C1 de la molécula de VWF modificada de la invención difiere de la secuencia de aminoácidos del dominio C1 de la SEQ ID NO: 2 en dos (y no más) aminoácidos.

En una tercera realización, la molécula de VWF modificada de la presente invención comprende los aminoácidos 2255-2333 de la SEQ ID NO: 2, excepto un aminoácido, en el que dicho aminoácido se ha eliminado o sustituido con un aminoácido no presente en la posición respectiva dentro de SEQ ID NO: 2. Es decir, la secuencia de aminoácidos del

dominio C1 de la molécula de VWF modificada de la invención difiere de la secuencia de aminoácidos del dominio C1 de SEQ ID NO: 2 en uno (y no más) aminoácido.

5 El sitio de O-glicosilación en la posición 2298 de la secuencia de aminoácidos de VWF se inactiva eliminando la treonina en la posición 2298 o sustituyéndola con un aminoácido diferente, preferiblemente con un aminoácido distinto de treonina y serina.

Por consiguiente, la invención proporciona en una realización adicional una molécula de VWF modificada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10. En aspectos preferidos, la molécula de VWF de la presente invención comprende

- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa está ausente;
- 10 • la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es glicina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es alanina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es arginina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es asparagina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es ácido aspártico;
- 15 • la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es cisteína;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es ácido glutámico;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es glutamina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es histidina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es isoleucina;
- 20 • la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es leucina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es lisina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es metionina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es fenilalanina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es prolina;
- 25 • la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es triptófano;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es tirosina; o
- la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 10 en la que Xaa es valina.

30 Típicamente, la molécula de VWF modificada de la presente invención comprende además un dominio D'D3. Preferiblemente, la molécula de VWF modificada comprende los aminoácidos 764 a 1242 de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferiblemente de al menos 95 %, más preferiblemente de al menos 98 % a una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 764 a 1242 de la SEQ ID NO: 2.

35 En una realización adicional, la molécula de VWF modificada de la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 11. En aspectos preferidos, la molécula de VWF de la presente invención comprende o consiste en

- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en donde Xaa está ausente;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es glicina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es alanina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es arginina;
- 40 • la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es asparagina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es ácido aspártico;

- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es cisteína;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es ácido glutámico;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es glutamina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es histidina;
- 5 • la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es isoleucina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es leucina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es lisina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es metionina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es fenilalanina;
- 10 • la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es prolina;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es triptófano;
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es tirosina; o
- la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la que Xaa es valina.

15 Como alternativa, el sitio de O-glicosilación en la posición 2298 se inactiva eliminando o sustituyendo uno o más aminoácidos que están implicados en el reconocimiento del sitio de glicosilación por las glicosiltransferasas. El supuesto motivo de glicosilación comprende los aminoácidos 2292-2303 de VWF. En una realización, al menos una prolina en las posiciones 2295, 2297 y/o 2302 se elimina o sustituye con un aminoácido diferente. Alternativamente, al menos una treonina en las posiciones 2292, 2293 y/o 2303 se elimina o sustituye con un aminoácido diferente.

20 La molécula de VWF modificada de la presente invención es capaz de unirse a una molécula de Factor VIII, y/o comprende un dominio D' y un dominio D3 (por ejemplo, el dominio D' y el dominio D3 de SEQ ID NO: 3) Preferiblemente, la molécula de VWF modificada es capaz de unirse a la forma madura del Factor VIII nativo humano. En otra realización, la molécula de VWF modificada es capaz de unirse a la molécula de Factor VIII de cadena sencilla que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12.

25 La unión de VWF al Factor VIII se puede determinar usando un kit ELISA listo para su uso distribuido comercialmente (Asserachrom VWF: FVIII B, Diagnostica Stago, Asnieres, Francia) basado en la descripción del procedimiento informada anteriormente (Veyradier et al. (2011) Haemophilia, vol. 17, págs. 944-951). Las muestras se diluyen con tampones de dilución listos para su uso, definidos respectivamente por el proveedor del kit de prueba. El VWF presente en las muestras por analizar es capturado por un anticuerpo policlonal anti-VWF de conejo, previamente dispuesto como recubrimiento en placas de microtitulación. Posteriormente, el FVIII endógeno potencialmente presente se disocia del VWF y se elimina. Después de agregar FVIII recombinante que interactuó con el VWF capturado, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-FVIII humano unido con peroxidasa se une al FVIII adjunto y la reacción subsiguiente del sustrato se detuvo con ácido sulfúrico 1 M y después de un tiempo de reacción de 5 minutos, se cuantifica fotométricamente a 450 nm. Los resultados de la prueba se calculan utilizando el estándar relacionado con el kit de prueba.

35 Como alternativa, se puede utilizar un ensayo de unión de citometría de flujo/equilibrio, por ejemplo, según lo descrito por Bendetowicz et al. (1998) Blood, vol 92, No 2: pp 529-538.

Factor VIII

40 Los términos "Factor VIII" y "FVIII" se usan como sinónimos en el presente documento. "FVIII" incluye variaciones alélicas naturales de FVIII que pueden existir y presentarse de un individuo a otro. El FVIII puede derivarse del plasma o producirse de forma recombinante, utilizando procedimientos bien conocidos de producción y purificación. El grado y la ubicación de la glucosilación, la sulfatación de tirosina y otras modificaciones posteriores a la traducción pueden variar, dependiendo de la célula huésped elegida y sus condiciones de crecimiento.

45 El término FVIII incluye análogos de FVIII. El término "análogo de FVIII" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de FVIII (de longitud completa o truncada/eliminada en el dominio B) en la que uno o más aminoácidos han sido sustituidos o eliminados en comparación con la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de FVIII (es decir, la secuencia definida por el identificador UniProt P00451) o, para las moléculas de FVIII truncadas/eliminadas en el dominio B, la parte correspondiente de esa secuencia de aminoácidos. Los análogos de FVIII no se presentan en la naturaleza, sino que se obtienen por manipulación humana. Las moléculas de Factor VIII usadas según la presente invención también pueden ser moléculas de FVIII truncadas/eliminadas en el dominio B en
50 las que los dominios restantes corresponden a las secuencias tal como se establece en los números de aminoácidos

1-740 y 1649-2332 de la secuencia de aminoácidos FVIII tipo salvaje. Otras formas de moléculas de FVIII eliminadas en el dominio B tienen adicionalmente una eliminación parcial en su dominio a3, lo que conduce a moléculas de FVIII de cadena única.

5 Se deduce que estas moléculas de FVIII son moléculas recombinantes producidas en células huésped transformadas, preferiblemente de origen mamífero. Sin embargo, los dominios restantes en un FVIII con dominio B eliminado (es decir, los tres dominios A, los dos dominios C y las regiones a1, a2 y a3) pueden diferir ligeramente, por ejemplo, aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o 5 % de la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje respectivo (aminoácidos 1-740 y 1649-2332).

10 Las moléculas de FVIII usadas de acuerdo con la presente invención pueden ser moléculas de FVIII de dos cadenas o moléculas de FVIII de cadena sencilla. Las moléculas de FVIII incluidas en la composición de la presente invención también pueden ser fragmentos biológicamente activos de FVIII, es decir, FVIII en el que se ha/han eliminado o truncado dominios distintos del dominio B, pero en el que la molécula de FVIII en la forma eliminada/ truncada conserva su capacidad de soportar la formación de un coágulo de sangre. La actividad de FVIII puede evaluarse *in vitro* utilizando técnicas bien conocidas en el arte. Una prueba preferida para determinar la actividad de FVIII de acuerdo con esta invención es el ensayo de sustrato cromogénico o el ensayo de una etapa (véase más adelante). Se pueden introducir modificaciones de aminoácidos (sustituciones, eliminaciones, etc.) en los dominios restantes, por ejemplo, para modificar la capacidad de unión del Factor VIII con diversos otros componentes, como por ejemplo VWF, proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LPR), diversos receptores, otros factores de coagulación, superficies celulares, etc. o para introducir y/o abolir sitios de glicosilación, etc. Otras mutaciones que no eliminan la actividad de FVIII también pueden acomodarse en una molécula/análogo de FVIII para su uso en una composición de la presente invención.

Los análogos de FVIII también incluyen moléculas de FVIII, en las que uno o más de los residuos de aminoácidos del polipéptido original se han eliminado o sustituido con otros residuos de aminoácidos, y/o en los que se han agregado residuos de aminoácidos adicionales al polipéptido VIII original.

25 Además, las moléculas/análogos de Factor VIII pueden comprender otras modificaciones en por ejemplo, el dominio B truncado y/o en uno o más de los otros dominios de las moléculas ("derivados de FVIII"). Estas otras modificaciones pueden estar en forma de diversas moléculas conjugadas con la molécula del Factor VIII, como por ejemplo, compuestos poliméricos, compuestos peptídicos, compuestos derivados de ácidos grasos, etc.

30 El término FVIII incluye FVIII glicopegulado. En el presente contexto, el término "FVIII glicopegulado" pretende designar una molécula de Factor VIII (incluyendo FVIII de longitud completa y FVIII truncado/eliminado en el dominio B) en el que uno o más grupos de PEG se han unido al FVIII polipéptido a través de las cadenas laterales de polisacárido (glicano(s)) del polipéptido.

35 El término FVIII incluye moléculas de FVIII que tienen grupos protectores o unidades estructurales que prolongan la semivida. Los términos "grupos protectores"/"unidades estructurales que extienden la semivida" se entiende aquí para referirse a uno o más grupos químicos unidos a una o más funcionalidades de la cadena del sitio de aminoácidos tales como -SH, -OH, -COOH, -CONH₂, -NH₂, o una o más estructuras de N- y/o O-glucano y que pueden aumentar la semivida circulatoria *in vivo* de varias proteínas/péptidos terapéuticos cuando se conjugan con estas proteínas/péptidos. Ejemplos de grupos protectores/unidades estructurales que prolongan la semivida incluyen: ácidos grasos biocompatibles y derivados de los mismos, hidroxialquilalmidón (HAS), por ejemplo, hidroxietilalmidón (HES), poli(serie Glyx)_n, (Homopolímero de aminoácido (HAP)), ácido hialurónico (HA), polímeros Heparosan (HEP), polímeros basados en fosforilcolina (polímero PC), polímeros Fleximer[®] (Mersana Therapeutics, MA, Estados Unidos), dextrano, ácidos polisialícos (PSA), polietilenglicol (PEG), un dominio Fc, péptidos similares a la transferrina, albúmina, elastina, polímeros XTEN[®] (Amunix, CA, Estados Unidos), péptidos de unión a la albúmina, un fragmento del factor de von Willebrand (fragmento VWF), un péptido carboxilo terminal (péptido CTP, Prolor Biotech, IL) y cualquier combinación de los mismos (véase, por ejemplo, McCormick, C.L., A.B. Lowe and N. Ayres, polímeros solubles en agua, en Encyclopedia of Polymer Science and Technology. 2002, John Wiley & Sons, Inc.). La forma de preparación de derivados no es crítica y se puede dilucidar de lo anterior.

50 Las moléculas de FVIII que se pueden usar de acuerdo con esta invención incluyen proteínas de fusión que comprenden una secuencia de aminoácidos de FVIII fusionada a una secuencia de aminoácidos heteróloga, preferiblemente una secuencia de aminoácidos que se extiende a la semivida. Las proteínas de fusión preferidas son las proteínas de fusión Fc y las proteínas de fusión de albúmina. El término "proteína de fusión de Fc" pretende en este documento abarcar FVIII fusionado a un dominio Fc que puede derivarse de cualquier isotipo de anticuerpo. A menudo se preferirá un dominio IgG Fc debido a la semivida circulatoria relativamente larga de los anticuerpos IgG. El dominio Fc puede modificarse además para modular ciertas funciones efectoras tales como por ejemplo complemento de unión y/o unión a ciertos receptores Fc. La fusión de FVIII con un dominio Fc, que tiene la capacidad de unirse a los receptores FcRn, generalmente dará como resultado una semivida circulatoria prolongada de la proteína de fusión en comparación con la semivida del FVIII de tipo salvaje. Se deduce que una molécula de FVIII para su uso en la presente invención también puede ser un derivado de un análogo de FVIII, tal como, por ejemplo, una proteína de fusión de un análogo de FVIII, un análogo de FVIII PEGilado o glucoPEGilado, o un análogo de FVIII conjugado con un polímero de heparosano. El término "proteína de fusión de albúmina" pretende en este documento

abarcando FVIII fusionado a una secuencia de aminoácidos de albúmina o un fragmento o derivado de la misma. La secuencia de aminoácidos heteróloga puede fusionarse con el extremo N o C del FVIII, o puede insertarse internamente dentro de la secuencia de aminoácidos del FVIII. La secuencia de aminoácidos heteróloga puede ser cualquier "polipéptido que extiende la semividua" descrito en el documento WO 2008/077616 A1, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

Ejemplos de moléculas de FVIII para su uso en composiciones de la presente invención comprenden, por ejemplo, las moléculas de FVIII descritas en WO 2010/045568, WO 2009/062100, WO 2010/014708, WO 2008/082669, WO 2007/126808, US 2010/0173831, US 2010/0173830, US 2010/0168391, US 2010/0113365, US 2010/0113364, WO 2003/031464, WO 2009/108806, WO 2010/102886, WO 2010/115866, WO 2011/101242, WO 2011/101284, WO 2011/101277, WO 2011/131510, WO 2012/007324, WO 2011/101267, WO 2013/083858 y WO 2004/067566.

Ejemplos de moléculas de FVIII, que pueden usarse en una composición de la presente invención incluyen el ingrediente activo de Advate[®], Helixate[®], Kogenate[®], Xyntha[®] así como la molécula de FVIII descrita en WO 2008/135501, WO 2009/007451 y el constructo designado "dBN(64-53)" del documento WO 2004/067566 (SEQ ID NO: 12).

15 Tratamiento del trastorno de coagulación

Las moléculas de VWF modificadas de la invención son útiles para tratar los trastornos de la coagulación, hemofilia A y enfermedad de von Willebrand.

El término "hemofilia A" se refiere a una deficiencia en la coagulación funcional FVIII, que generalmente se hereda.

El término "enfermedad de von Willebrand" (VWD) se refiere a una anomalía de la coagulación asociada con una deficiencia cualitativa o cuantitativa de VWF.

El tratamiento de una enfermedad abarca el tratamiento de pacientes ya diagnosticados con cualquier forma de la enfermedad en cualquier etapa o manifestación clínica; el retraso del inicio o evolución o agravamiento o deterioro de los síntomas o signos de la enfermedad; y/o prevenir y/o reducir la gravedad de la enfermedad.

Un "sujeto" o "paciente" al que se administra una molécula de VWF modificada de la invención puede ser un mamífero, tal como un no primate (por ejemplo, vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata, etc.) o un primate (por ejemplo, mono o humano). En ciertos aspectos, el humano es un paciente pediátrico. En otros aspectos, el humano es un paciente adulto.

En el presente documento se describen composiciones que comprenden una molécula de VWF modificada de la invención y, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como los segundos agentes terapéuticos descritos a continuación. Las composiciones típicamente se suministran como parte de una composición farmacéutica estéril que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del procedimiento deseado de administración a un paciente).

Las moléculas de VWF modificadas de la invención pueden administrarse a un paciente por una variedad de rutas tales como oral, transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa, intramuscular, intratecal, tópica o local. La ruta más adecuada para la administración en cualquier caso dado dependerá de la molécula particular por administrar, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del sujeto. Típicamente, una molécula de VWF modificada de la invención se administrará por vía intravenosa.

En realizaciones típicas, una molécula de VWF modificada de la invención está presente en una composición farmacéutica a una concentración suficiente para permitir la administración intravenosa de 0,5 mg/kg a 20 mg/kg. En algunas realizaciones, la concentración de molécula de VWF modificada adecuada para su uso en las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento incluye, pero no se limita a, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, o una concentración que oscila entre cualquiera de los valores anteriores, por ejemplo, 1 mg/kg a 10 mg/kg, 5 mg/kg a 15 mg/kg o 10 mg/kg a 18 mg/kg.

La dosis efectiva de una molécula de VWF modificada de la invención puede variar de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 750 mg/kg por administración única (por ejemplo, bolo), administraciones múltiples o administración continua, o para lograr una concentración sérica de 0,01-5000 concentración sérica de µg/ml por administración única (por ejemplo, bolo), administraciones múltiples o administración continua, o cualquier rango o valor efectivo en el mismo dependiendo de la afección a tratar, la vía de administración y la edad, peso y afección del sujeto. En ciertas realizaciones, cada dosis puede variar de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal o de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 30 mg por kilogramo de peso corporal. La molécula de VWF modificada puede formularse como una solución acuosa.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de una molécula de VWF modificada de la invención por dosis. Dicha unidad puede contener de 0,5 mg a 5 g, por ejemplo, pero sin limitación, 1 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 100 mg, 200

mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 750 mg, 1000 mg, o cualquier rango entre cualquiera de los dos valores anteriores, por ejemplo 10 mg a 1000 mg, 20 mg a 50 mg o 30 mg a 300 mg. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo, por ejemplo, de la afección a tratar o la vía de administración.

5 La determinación de la dosificación efectiva, el número total de dosis y la duración del tratamiento con una molécula de VWF modificada de la invención está dentro de las capacidades de los expertos en la materia, y puede determinarse usando un estudio de aumento de dosis estándar.

10 Las formulaciones terapéuticas de las moléculas de VWF modificadas de la invención adecuadas en los procedimientos descritos en el presente documento pueden prepararse para almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mezclando la molécula de VWF modificada que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables típicamente empleados en la técnica (todos los cuales se denominan en el presente documento "portadores"), es decir, agentes tamponantes, agentes estabilizantes, conservantes, de isotonicidad, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros aditivos misceláneos. Véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición (Osol, ed. 1980). Dichos aditivos no deben ser tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas.

15 Los agentes tamponantes ayudan a mantener el pH en el rango que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Pueden presentarse a concentraciones que varían de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes tamponantes adecuados incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos y sales de los mismos, tales como tampones de citrato (por ejemplo, mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico, etc.), tampones de succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, mezcla de ácido succínico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido succínico-succinato disódico, etc.), tampones de tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato de sodio, mezcla de ácido tartárico-tartrato de potasio, mezcla de ácido tartárico-hidróxido de sodio, etc.), tampones de fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico, mezcla de ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla de fumarato monosódico-fumarato disódico, etc.), tampones de gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gluconato de sodio, mezcla de ácido glucónico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido glucónico y gluconato de potasio, etc.), tampón de oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico-oxalato de sodio, mezcla de ácido oxálico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido oxálico-oxalato de potasio etc.), tampones de lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico-lactato de sodio, mezcla de ácido láctico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido láctico-lactato de potasio, etc.) y tampones de acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético-acetato de sodio, mezcla de ácido acético-hidróxido de sodio, etc.). Además, se pueden usar tampones de fosfato, tampones de histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

20 Se pueden agregar conservantes para retardar el crecimiento microbiano, y se pueden agregar en cantidades que varían de 0,2 % a 1 % (p/v). Los conservantes adecuados incluyen fenol, alcohol bencílico, meta- cresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio y parabenos de alquilo como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol. Se pueden agregar isotonicificadores a veces conocidos como "estabilizadores" para asegurar la isotonicidad de las composiciones líquidas e incluir alcoholes de azúcar polihídricos, preferiblemente alcoholes de azúcar trihidroxilados o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol. Los estabilizadores se refieren a una amplia categoría de excipientes que pueden variar en función de un agente de carga a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir la desnaturalización o la adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizadores típicos pueden ser alcoholes de azúcar polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, como lactosa, trehalosa, estaquirosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol y similares, incluidos los cicitolos como el inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, péptidos de 10 residuos o menos); proteínas tales como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como monosacáridos de polivinilpirrolidona, tales como xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos como el dextrano. Los estabilizadores pueden estar presentes en el rango de 0,1 a 10.000 partes por peso de proteína activa.

45 Se pueden agregar tensioactivos o detergentes no iónicos (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico así como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por la agitación, que también permite que la formulación se exponga a superficie de cizallamiento estresada sin causar desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles plurónicos, monoéteres de polioxiethylensorbitán (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un rango de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, o en un rango de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

Los excipientes misceláneos adicionales incluyen agentes de carga (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E) y codisolventes.

La formulación en el presente documento también puede contener un segundo agente terapéutico además de una molécula de VWF modificada de la invención. Más adelante se proporcionan ejemplos de segundos agentes terapéuticos adecuados.

5 El programa de dosificación puede variar de una vez al mes a diario dependiendo de una serie de factores clínicos, que incluyen el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la sensibilidad del paciente a la molécula de VWF modificada de la invención. En realizaciones específicas, una molécula de VWF modificada de la invención se administra diariamente, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cada 5 días, cada 10 días, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas o una vez al mes, o en cualquier rango entre dos de los valores anteriores, por ejemplo, cada cuatro semanas a cada mes, de cada 10 días a cada dos semanas, o de dos a tres veces por semana, etc.

10 La dosificación de una molécula de VWF modificada de la invención por administrar variará de acuerdo con la molécula de VWF modificada particular, el sujeto y la naturaleza y gravedad de la enfermedad, la condición física del sujeto, el régimen terapéutico (por ejemplo, si se usa un segundo agente terapéutico) y la ruta de administración seleccionada; la dosis apropiada puede ser determinada fácilmente por un experto en la materia.

15 Un experto en la materia reconocerá que la cantidad óptima y el espaciamiento de las dosificaciones individuales de una molécula de VWF modificada de la invención estará determinada por la naturaleza y el alcance de la afección por tratar, la forma, la ruta y lugar de administración, y la edad y el estado del sujeto particular que se está tratando, y que un médico determinará en última instancia las dosis apropiadas que se han de utilizar. Esta dosis puede repetirse tantas veces como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosis puede alterarse o reducirse, de acuerdo con la práctica clínica normal.

Terapia de combinación

Preferentemente, el paciente que se está tratando con la molécula de VWF modificada de la invención también se trata con una terapia convencional para trastornos de la coagulación. Por ejemplo, un paciente que padece hemofilia generalmente también está siendo tratado con el factor VIII de coagulación sanguínea (Factor VIII).

25 La concentración de Factor VIII en la composición utilizada según la presente invención está típicamente en el rango de 10-10.000 UI/ml. En diferentes realizaciones, la concentración de moléculas de FVIII en las composiciones de la invención está en el rango de 10-8.000 UI/ml, o 10-5.000 UI/ml, o 20-3.000 UI/ml, o 50-1.500 UI/ml, o 3.000 UI/ml, o 2.500 UI/ml, o 2.000 UI/ml, o 1.500 UI/ml, o 1.200 UI/ml, 1.000 UI/ml, u 800 UI/ml, o 600 UI/ml, o 500 UI/ml, o 400 UI/ml, o 300 UI/ml, o 250 UI/ml, o 200 UI/ml, o 150 UI/ml, o 100 UI/ml.

30 La "Unidad Internacional", o "UI", es una unidad de medida de la actividad de coagulación sanguínea (potencia) del FVIII medida por un ensayo de actividad de FVIII tal como un ensayo de coagulación de una etapa o un ensayo de actividad de FVIII de sustrato cromogénico usando un estándar calibrado contra una preparación estándar internacional calibrada en "IU". Los ensayos de coagulación en una etapa son conocidos en la técnica, como los descritos en N Lee, Martin L, et al., An Effect of Predilution on Potency Assays of FVIII Concentrates, Thrombosis Research (Pergamon Press Ltd.) 30, 511 519 (1983). Principio del ensayo de una etapa: la prueba se ejecuta como una versión modificada del ensayo de tiempo parcial de tromboplastina (aPTT) activada: la incubación de plasma con fosfolípidos y un activador de superficie conduce a la activación de factores del sistema de coagulación intrínseco. La adición de iones de calcio desencadena la cascada de coagulación. Se determina el tiempo de formación de un coágulo de fibrina medible. El ensayo se ejecuta en presencia de plasma deficiente en factor VIII. La capacidad de coagulación del plasma deficiente se restablece mediante el Factor VIII de coagulación incluido en la muestra por analizar. El acortamiento del tiempo de coagulación es proporcional a la cantidad de Factor VIII presente en la muestra. La actividad del Factor VIII de la coagulación se cuantifica por comparación directa con una preparación estándar con una actividad conocida del Factor VIII en unidades internacionales.

35 Otro ensayo estándar es un ensayo de sustrato cromogénico. Los ensayos de sustrato cromogénico se pueden adquirir comercialmente, como el kit de prueba Coamatic FVIII (Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA V. le Monza 338-20128 Milano, Italia). Principio del ensayo cromogénico: En presencia de calcio y fosfolípidos, el factor X se activa por el factor IXa al factor Xa. Esta reacción es estimulada por el Factor VIIIa como cofactor. El FVIIIa es formado por bajas cantidades de trombina en la mezcla de reacción del FVIII en la muestra por medir. Cuando se usan las concentraciones óptimas de Ca²⁺, fosfolípidos y Factor IXa y una cantidad en exceso de Factor X, la activación del Factor X es proporcional a la potencia del Factor VIII. El Factor X activado libera el pNA cromóforo del sustrato cromogénico S-2765. La liberación de pNA, medida a 405 nm, es por lo tanto proporcional a la cantidad de FXa formada y, por lo tanto, también a la actividad del Factor VIII de la muestra.

45 En una realización, el tratamiento comprende administrar la molécula de VWF modificada de la invención y el Factor VIII a un paciente que padece hemofilia, preferiblemente hemofilia A.

55 En otra realización, el tratamiento comprende administrar la molécula de VWF modificada de la invención y un compuesto capaz de unirse a CLEC10A a un paciente que padece VWD o hemofilia, preferiblemente hemofilia A.

En otra realización más, el tratamiento comprende administrar la molécula de VWF modificada de la invención, una molécula de Factor VIII y un compuesto capaz de unirse a CLEC10A a un paciente que padece hemofilia, preferiblemente hemofilia A.

5 En una realización particular, la molécula de VWF modificada de la invención y el segundo agente terapéutico (por ejemplo, Factor VIII y/o un compuesto capaz de unirse a CLEC10A) se administran simultáneamente. En otra realización, la molécula de VWF modificada de la invención y el segundo agente terapéutico (por ejemplo, Factor VIII y/o un compuesto capaz de unirse a CLEC10A) se administran por separado. El tiempo entre la administración de la molécula de VWF modificada de la invención y el segundo agente terapéutico (por ejemplo, Factor VIII y/o un compuesto capaz de unirse a CLEC10A) no está particularmente limitado. Se prefiere que la molécula de VWF modificada de la invención se administre antes del compuesto capaz de unirse a CLEC10A.

CLEC10A

15 La CLEC10A, también conocida como lectina de tipo Gal de macrófago, es una proteína receptora transmembrana de tipo II humana de la familia CLEC. Otros sinónimos son el miembro 14 de la superfamilia de lectina de tipo C, lectina 2 de macrófagos y CD301. La CLEC10A está estrechamente relacionada con las proteínas hepáticas ASGPR, pero se expresa en monocitos intermedios, macrófagos y células dendríticas. Como se usa en el presente documento, el término "CLEC10A" se refiere a una proteína humana que tiene o que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la base de datos UniProt bajo uno de los identificadores Q8IUN9-1, Q8IUN9-2 y Q8IUN9-3. Más preferiblemente, la CLEC10A comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la base de datos UniProt bajo uno de los identificadores Q8IUN9-1.

20 Compuesto capaz de unirse a CLEC10A

El tipo o clase del compuesto capaz de unirse a CLEC10A (en lo sucesivo denominado "el compuesto") no está particularmente limitado. Sin embargo, preferiblemente, el compuesto es un péptido o polipéptido, lo más preferiblemente el compuesto es un anticuerpo o un fragmento del mismo.

25 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une a un antígeno particular, o es inmunológicamente reactivo, e incluye formas de anticuerpos policlonales, monoclonales, modificadas genéticamente y modificadas de otro modo, que incluyen pero no se limitan a anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos), anticuerpos de dominio único (nanocuerpos) y fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos, incluidos, por ejemplo, Fab', F(ab')₂, fragmentos Fab, Fv, rIgG y scFv. Además, a menos que se indique lo contrario, el término "anticuerpo monoclonal" (mAb) debe incluir tanto moléculas intactas como fragmentos de anticuerpos (como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que son capaces de enlazarse a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación del animal o la planta y pueden tener una unión a tejido menos específica que un anticuerpo intacto (Wahl et al, 1983, J Nucl. Med. 24: 316).

35 El anticuerpo usado en la invención es capaz de unirse a al menos una variante de CLEC10A. En otras realizaciones, el anticuerpo es capaz de unirse al dominio extracelular de CLEC10A, por ejemplo, a un epítipo dentro de los aminoácidos 61-316 de la secuencia de aminoácidos de CLEC10A. Preferiblemente, el anticuerpo se une al sitio de unión a lectina de CLEC10A.

40 También se prefiere que el anticuerpo se una específicamente a CLEC10A. En una realización, el anticuerpo es capaz de unirse a CLEC10A, pero no es capaz de unirse a todos los siguientes receptores: ASGPR1, CLEC10A, COLEC12, CLEC4F, CLEC4M, SCARA5 y MMR. En otra realización, el anticuerpo es capaz de unirse a CLEC10A, pero no es capaz de unirse a ASGPR1 (identificador UniProt: P07306). En otra realización, el anticuerpo es capaz de unirse a CLEC10A, pero no es capaz de unirse a COLEC12 (identificador UniProt: Q5KU26). En otra realización, el anticuerpo es capaz de unirse a CLEC10A, pero no es capaz de unirse a CLEC4F (identificador UniProt: Q8N1N0). En otra realización, el anticuerpo es capaz de unirse a CLEC10A, pero no es capaz de unirse a CLEC4M (identificador UniProt: Q9H2X3). En otra realización, el anticuerpo es capaz de unirse a CLEC10A, pero no es capaz de unirse a SCARA5 (identificador UniProt: Q6ZMJ2). En otra realización, el anticuerpo es capaz de unirse a CLEC10A, pero no es capaz de unirse a MMR (identificador UniProt: P22897). En otra realización más, el anticuerpo es capaz de unirse a CLEC10A, pero no es capaz de unirse a ninguno de los siguientes receptores: ASGPR1, CLEC10A, COLEC12, CLEC4F, CLEC4M, SCARA5 y MMR.

55 En otra realización, el anticuerpo es capaz de unirse a al menos un ortólogo murino de CLEC10A. En esa realización, el anticuerpo puede ser capaz de unirse a MGL1, a MGL2, o tanto a MGL1 como a MGL2. El anticuerpo puede ser capaz de unirse a una proteína que tiene o que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en el identificador de UniProt No. P49300. El anticuerpo puede ser capaz de unirse a una proteína que tiene o que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en el identificador de UniProt No. F8WHB7. El anticuerpo puede ser capaz de unirse a una proteína que tiene o que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en el identificador de UniProt No. Q8JZN1.

En otra realización, el anticuerpo es capaz de unirse al ortólogo de rata de CLEC10A. En otra realización, el anticuerpo es capaz de unirse al ortólogo de conejo de CLEC10A. En otra realización, el anticuerpo es capaz de unirse al ortólogo de *Macaca fascicularis* y/o al ortólogo de *Macaca mulatta* de CLEC10A.

5 La constante de disociación K_D para el complejo formado por CLEC10A y el anticuerpo es preferiblemente menor que 100 nM, más preferiblemente menor que 10 nM, lo más preferiblemente menor que 5 nM. Típicamente, el K_D varía de aproximadamente 10 pM a aproximadamente 100 nM, o de aproximadamente 100 pM a aproximadamente 10 nM, o de aproximadamente 500 pM a aproximadamente 5 nM.

10 Preferentemente, el anticuerpo usado en esta invención es un anticuerpo monoclonal. El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o fago, y no el procedimiento por el cual se produce. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en el arte, que incluyen el uso de hibridoma, tecnologías recombinantes y de presentación de fagos, o una combinación de las mismas. (Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N.Y.).

15 En otras realizaciones, que incluyen el uso *in vivo* de los anticuerpos anti-CLEC10A en humanos, pueden usarse anticuerpos quiméricos, primatizados, humanizados o humanos. En una realización preferente, el anticuerpo es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, más preferiblemente un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal humanizado.

20 El término anticuerpo "quimérico" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que tiene secuencias variables derivadas de inmunoglobulinas no humanas, tales como anticuerpos de rata o ratón, y regiones constantes de inmunoglobulinas humanas, típicamente elegidas de una plantilla de inmunoglobulina humana. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229 (4719): 1202-7; Oi et al., 1986, BioTechniques 4: 214-221; Gillies et al., 1985, J. Immunol. Methods 125: 191-202; Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

25 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a la diana) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una plantilla de inmunoglobulina humana elegida. La humanización es una técnica para fabricar un anticuerpo quimérico en el que uno o más aminoácidos o porciones del dominio variable humano han sido sustituidos por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos generadas en una especie no humana que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las especies no humanas y regiones marco (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los residuos marco en las regiones marco humanas se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones marco se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, modelando las interacciones de la CDR y los residuos marco para identificar los residuos marco importantes para la unión del antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos marco inusuales en posiciones particulares. Véanse, por ejemplo, Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-7 y Queen et al, Patentes estadounidenses Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; y 6,180,370 (cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad). Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de técnicas conocidas en el arte que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (EP239400; publicación PCT WO 91/09967; Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,225,539; 5,530,101 y 5,585,089), revestimiento o recubrimiento en superficie (EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol, 28: 489-498; Studnicka et al, 1994, Prot. Eng. 7: 805-814; Roguska et al, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 969-973, y mezcla aleatoria de cadenas (Patente de los Estados Unidos No 5,565,332), todas las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados se preparan como se describe en Queen et al, Patentes de los Estados Unidos Nos: 5,530,101; 5,585,089; 5.693.761; 5.693.762; y 6,180,370 (cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad).

55 En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CLEC10A son anticuerpos humanos. Los anticuerpos anti-CLEC10A completamente "humanos" pueden ser deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Como se usa en el presente documento, los "anticuerpos humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas. Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluidos los procedimientos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de

anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse las Patentes Estadounidenses números 4,444,887 y 4,716,111; y publicaciones PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulinas humanas. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; y 5,939,598, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado se pueden generar utilizando una técnica denominada "selección guiada". En esta metodología, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers et al, 1988, *Biotechnology* 12: 899-903).

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CLEC10A son anticuerpos primatizados. El término "anticuerpo primatizado" se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de mono y regiones constantes humanas. Los procedimientos para producir anticuerpos primatizados son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses números 5,658,570; 5,681,722; y 5,693,780, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CLEC10A son anticuerpos derivados. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los anticuerpos derivados que se han modificado, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína (véase infra para una discusión de los conjugados de anticuerpos), etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CLEC10A o sus fragmentos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos cuya secuencia ha sido modificada para reducir al menos una función efectora biológica mediada por una región constante con respecto a la secuencia de tipo salvaje correspondiente. Para modificar un anticuerpo anti-CLEC10A de modo que exhiba una unión reducida al receptor Fc, el segmento de la región constante de inmunoglobulina del anticuerpo puede mutarse en regiones particulares necesarias para las interacciones del receptor Fc (FcR) (véase, por ejemplo, Canfield and Morrison, 1991, *J. Exp. Med.* 173: 1483-1491; y Lund et al., 1991, *J. Immunol.* 147: 2657-2662). La reducción en la capacidad de unión de FcR del anticuerpo también puede reducir otras funciones efectoras que dependen de las interacciones de FcR, como la opsonización y la fagocitosis y la citotoxicidad celular dependiente de antígeno.

En otros aspectos, los anticuerpos anti-CLEC10A o sus fragmentos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se han modificado para aumentar o reducir sus afinidades de unión al receptor Fc fetal, FcRn. Para alterar la afinidad de unión a FcRn, el segmento de la región constante de inmunoglobulina del anticuerpo puede mutarse en regiones particulares necesarias para las interacciones de FcRn (véase, por ejemplo, WO 2005/123780). El aumento de la afinidad de unión a FcRn debería aumentar la semivida en suero del anticuerpo, y la reducción de la afinidad de unión a FcRn debería reducir a la inversa la semivida en suero del anticuerpo. En realizaciones particulares, el anticuerpo anti-CLEC10A es de la clase IgG en la que al menos uno de los residuos de aminoácidos 250, 314 y 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con un residuo de aminoácido diferente del presente en el anticuerpo no modificado. Los anticuerpos de la clase IgG incluyen anticuerpos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La sustitución se puede hacer en la posición 250, 314 o 428 sola, o en cualquier combinación de las mismas, como en las posiciones 250 y 428, o en las posiciones 250 y 314, o en las posiciones 314 y 428, o en las posiciones 250, 314, y 428, con las posiciones 250 y 428 como combinación preferida. Para cada posición, el aminoácido sustituyente puede ser cualquier residuo de aminoácido diferente del presente en esa posición del anticuerpo no modificado. Para la posición 250, el residuo de aminoácido sustituyente puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto de treonina, que incluye, pero no se limita a, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, valina, triptófano o tirosina. Para la posición 314, el residuo de aminoácido sustituyente puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto de la leucina, que incluye, pero no se limita a, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano o tirosina. Para la posición 428, los residuos de aminoácidos sustituyentes pueden ser cualquier residuo de aminoácidos que no sea metionina, incluyendo, entre otros, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano o tirosina. Las combinaciones específicas de sustituciones de aminoácidos adecuadas se identifican en la Tabla 1 del documento WO 2005/123780, cuya tabla se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Véanse también, Hinton et al, Patentes de los Estados Unidos Nos. 7,217,797, 7,361,740, 7,365,168 y 7,217,798, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

En otros aspectos, un anticuerpo anti-CLEC10A tiene uno o más aminoácidos insertados en una o más de sus regiones hipervariables, por ejemplo como se describe en el documento US 2007/0280931.

Conjugados de anticuerpos

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CLEC10A son conjugados de anticuerpos que se modifican, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de modo que la unión covalente no interfiere con la unión a CLEC10A. Las técnicas para conjugar unidades estructurales efectoras con anticuerpos son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., En las páginas 623-53 (Robinson et al., eds., 1987)); Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62: 119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics* 83: 67-123).

En un ejemplo, el anticuerpo o fragmento del mismo se fusiona a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), opcionalmente en N-terminal o C-terminal, a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o parte de la misma; preferiblemente al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína). Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento del mismo, está unido a la otra proteína en N-terminal del dominio constante del anticuerpo. Se pueden usar procedimientos de ADN recombinante para crear tales fusiones, por ejemplo como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745. En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la semivida *in vivo*. Ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en el documento WO 2005/117984.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CLEC10A pueden unirse a unidades estructurales de poli(etilenglicol) (PEG). Por ejemplo, si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, las unidades estructurales de PEG se pueden unir a través de cualquier grupo funcional de aminoácidos de cadena lateral o terminal de aminoácidos disponible ubicado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libres. Dichos aminoácidos pueden aparecer naturalmente en el fragmento de anticuerpo o pueden manipularse en el fragmento usando procedimientos de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,219,996. Se pueden usar múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG. Preferiblemente, las unidades estructurales de PEG están unidas covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína ubicado en el fragmento de anticuerpo. Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión, se pueden usar unidades estructurales efectoras activadas apropiadamente, por ejemplo derivados selectivos de tiol tales como maleimidias y derivados de cisteína.

En otro ejemplo, un conjugado de anticuerpo anti-CLEC10A es un fragmento Fab' modificado que está PEGilado, es decir, tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente al mismo, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento divulgado en EP0948544. Véase también *Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications*, (J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, Nueva York, 1992); *Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications*, (J. Milton Harris and S. Zalipsky, eds., American Chemical Society, Washington D. C, 1997); y *Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences* (M. Aslam and A. Dent, eds., Grove Publishers, Nueva York, 1998); y Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 531-545.

Otra realización que se puede usar para bloquear el receptor CLEC10A es un dominio VWF-C1 que comprende el sitio de O-glicosilación en la posición 2298, unido a una unidad estructural que prolonga la semivida, tal como fusionado a albúmina, preferiblemente a través de un enlazante. Una realización preferente es la proteína de fusión con la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 9.

Kits

Otro aspecto de la presente invención es un kit farmacéutico que comprende (i) una molécula de VWF modificada como se define anteriormente y (ii) un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en Factor VIII, un compuesto (preferiblemente un anticuerpo) capaz de unirse a CLEC10A, y sus combinaciones. Preferiblemente, la molécula de VWF modificada y el polipéptido están contenidos en composiciones separadas.

Otro aspecto de la presente invención es un kit farmacéutico que comprende (i) una molécula de VWF modificada como se define anteriormente y (ii) un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en Factor VIII, un compuesto (preferiblemente un anticuerpo) capaz de unirse a CLEC10A, y sus combinaciones, para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un trastorno de la coagulación sanguínea.

Otro aspecto de la invención es el uso de una molécula de VWF modificada como se definió anteriormente para aumentar la semivida o reducir la eliminación del factor VIII.

El término "semivida" se refiere al tiempo que lleva eliminar la mitad de la proteína de la circulación *in vivo*. El área bajo la curva (AUC) se puede determinar para evaluar los efectos de la eliminación. Una reducción en la eliminación conduce a valores de AUC más altos y a un aumento en la semivida.

Aún otro aspecto de la invención es el uso de un compuesto (preferiblemente un anticuerpo) como se definió anteriormente para aumentar la semivida del Factor VIII, preferiblemente en un tratamiento terapéutico.

La invención se refiere además a un procedimiento para aumentar la semivida o reducir la eliminación del Factor VIII *in vivo*, que comprende administrar a un sujeto una cantidad efectiva de una molécula de VWF modificada como se definió anteriormente.

Un aspecto adicional de esta invención es un procedimiento de tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de una molécula de VWF modificada como se definió anteriormente.

- 5 Un aspecto adicional es el uso de una molécula de VWF modificada como se definió anteriormente para reducir la frecuencia de administración de FVIII en un tratamiento de hemofilia A. La frecuencia de administración intravenosa o subcutánea de FVIII puede reducirse a dos veces por semana. Alternativamente, la frecuencia de administración intravenosa o subcutánea de FVIII puede reducirse a una vez por semana.

- 10 Otro aspecto es el uso de una molécula de VWF modificada como se definió anteriormente para reducir la frecuencia de administración de VWF en un tratamiento de VWD. La frecuencia de la administración intravenosa o subcutánea de VWF puede reducirse a dos veces por semana. Alternativamente, la frecuencia de la administración intravenosa o subcutánea de VWF puede reducirse a una vez por semana. Es decir, la molécula de VWF modificada de la invención se administra una o dos veces por semana.

Otro aspecto es el uso de una molécula de VWF modificada como se definió anteriormente para reducir la dosis de FVIII por administrar en un tratamiento de la hemofilia A.

- 15 Otro aspecto es el uso de una molécula de VWF modificada como se definió anteriormente para reducir la dosis de VWF por administrar en un tratamiento de VWD.

La siguiente tabla resume las secuencias de nucleótidos y aminoácidos que se muestran en el listado de secuencias:

SEQ ID NO:	Observación
1	Secuencia de ADN que codifica el prepropéptido del VWF nativo humano
2	Secuencia de aminoácidos del prepropéptido de VWF nativo humano
3	Cebador
4	Cebador
5	Cebador
6	Cebador
7	Cebador
8	Cebador
9	Secuencia de aminoácidos de un dominio C1 de VWF humano, fusionado a albúmina humana a través de un enlazante Gly-Ser
10	Dominio C1 de un VWF modificado que tiene una mutación de T2298
11	Forma madura de VWF modificado que tiene una mutación de T2298
12	Molécula de factor VIII de cadena sencilla

Ejemplos

- 20 **Ejemplo 1: Se identificaron estructuras de glicosilación específicas presentes en VWF para interactuar con CLEC10A, así como también el sitio 2298 de glicanos ligados a O presente en VWF**

Para identificar el sitio de unión en VWF humano para CLEC10A, se incubaron fragmentos trípticos de VWF con CLEC10A soluble. Después del lavado, los fragmentos de proteínas unidas se eluyeron a pH 11 y usando una solución que contenía GalNAc 100 mM, respectivamente. Las condiciones de elución se eligieron con base en experimentos

preliminares de SPR que indicaban que todos los componentes unidos a CLEC10A se eluyen completamente bajo las condiciones definidas. Posteriormente, las respectivas fracciones de eluato se sometieron a análisis por MS.

Los N- y O-glucanos libres fueron permitilados y caracterizados por análisis MALDI-TOF-MS. Los datos resultantes demostraron que CLEC10A difería significativamente en su reconocimiento de N- y O-glucanos. En comparación con los fragmentos de VWF utilizados como material de partida (el análisis de glucano observó la presencia de O-glucanos no sialilados al 18 %), ambas fracciones de eluato revelaron un fuerte enriquecimiento de O-glucanos no sialilados mientras que los O-glucanos sialilados que contienen los residuos de NeuAc disminuyeron extremadamente, así como los N-glucanos, independientemente de su estado de sialilación. Las diferentes condiciones de elución (alcalinas versus GalNAc) dieron como resultado patrones de glucano solo ligeramente diferentes. Se pudieron identificar tres estructuras predominantes de O-glicosilación en las fracciones de eluato, que representaban aproximadamente el 80 % de todas las estructuras de O-glucano detectadas. Las estructuras respectivas se dan en la Figura 2. El enriquecimiento del núcleo 2 glicano (factor de concentración de más de 40), el núcleo 1 glicano que lleva un residuo NeuGc (factor de concentración de aproximadamente 9) y el núcleo 2 glicano alargado con el disacárido GlcNAc β 1,3Gal (factor de concentración de aproximadamente 7) se identificaron mediante análisis MALDI-TOF-MS. El factor de concentración mencionado entre paréntesis describe cuantitativamente el enriquecimiento del glucano respectivo, en comparación con el material de partida antes de la incubación con CLEC10A.

Además de la investigación descrita anteriormente, el análisis se realizó por nanocromatografía líquida de ionización por electropulverización MS/MS después de la desglicosilación de fragmentos de VWF. El patrón de péptido resultante detectado en cada una de las dos fracciones de eluato diferentes fue comparable y, por lo tanto, fue independiente de la condición de elución aplicada. Como resultado, los péptidos de VWF que contienen treonina 2298 se identificaron claramente después de la elución. La participación de otros fragmentos de VWF glicosilados en la unión a CLEC10A podría excluirse, con base en los datos analíticos obtenidos. Por lo tanto, es muy probable que el sitio de glucano unido a O T2298 contenga una estructura de glucano que no esté sialilada y, por lo tanto, interactúe con CLEC10A. Además, este sitio de glicosilación presente en VWF se identificó exclusivamente como un compañero de interacción predominante de CLEC10A y, por lo tanto, se descubrió que era el único responsable de la interacción del receptor. Todos los demás sitios de glicanos de VWF parecían no estar involucrados en la unión a CLEC10A.

En resumen, después de la elución de fragmentos de VWF digeridos en tríptico a partir de CLEC10A soluble, los análisis por MS demostraron que los O-glucanos no sializados se unían a CLEC10A, mientras que los O-glucanos sializados así como los N-glucanos independientemente de su estado de sialilación, no interactuaban con CLEC10A significativamente. Se identificaron tres estructuras predominantes de O-glicosilación (glicano nuclear 2, glicano nuclear 1 con un residuo NeuGc y glicano nuclear 2 alargado con el disacárido GlcNAc β 1,3Gal) presente en VWF como responsables de la interacción. Debido al hecho de que se detectó un factor de concentración extremadamente alto para el glucano nuclear 2 en comparación con las otras dos estructuras, este glucano presente en VWF parecía tener una fuerte afinidad con CLEC10A. Además, solo se identificaron péptidos VWF que contenían el sitio 2298 de glucano unido a O para unirse al CLEC10A, y por lo tanto contenían una estructura de glucano que no estaba sialilada. Finalmente, estos resultados fueron sorprendentes e indicaron que el sitio de glucano T2298 era el único responsable de la interacción VWF-CLEC10A. Además, los patrones de glicosilación observados parecían estar solo presentes en T2298. Sobre la base de estos resultados y la observación de que CLEC10A medió la eliminación de VWF, se puede sugerir que la eliminación de VWF glicosilado de forma nativa por CLEC10A solo se vio afectada por el sitio de glicosilación ligado a O 2298. En consecuencia, con el objetivo de prevenir la unión de CLEC10A, se puede suponer una eliminación disminuida de mutantes de VWF después de manipular el sitio de O-glicosilación respectivo y/o las estructuras de carbohidrato respectivas identificadas para estar presentes en este sitio de glicano.

Procedimientos

1) Reducción y carboximetilación de VWF

Un volumen de 30 ml de solución de VWF que se había purificado según el procedimiento descrito en la sección anterior se dializó adicionalmente durante la noche contra 1 l de tampón de reducción (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,5) a +4 °C. Este procedimiento se repitió nuevamente, excepto que la segunda diálisis se realizó durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución se ajustó a DTT 15 mM añadiendo una solución madre de DTT 1 M bajo agitación suave (IKA, Staufen, Alemania). La reducción de VWF se llevó a cabo por incubación durante 60 minutos a +37 °C. El VWF se alquiló luego con yodoacetamida 40 mM mediante la adición de una solución madre 1 M y la solución se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente.

2) Digestión enzimática de VWF monomérico purificado de plasma humano

Después de la reducción y alquilación basada en el procedimiento descrito anteriormente, 60 ml de VWF monomérico (concentración de proteína de 1 mg/ml) se dializó durante la noche a +4 °C a través del tubo de diálisis Membra-Cel MD25-14 (Serva, Heidelberg, Alemania) contra 20 l de NH₄HCO₃ 50 mM (pH 7,8). El paso de diálisis se repitió 2 veces. La resina de tripsina inmovilizada (Promega, Mannheim, Alemania) se lavó con NH₄HCO₃ 50 mM (pH 7,8) y se añadió a la solución de proteína, dando como resultado una concentración de 1 ml de resina de tripsina por 8 mg de proteína. Posteriormente, la suspensión se incubó en un mezclador rotativo (Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Alemania) a +37 °C durante 24 horas. Después de la reacción, la tripsina inmovilizada se separó por centrifugación (Multifuge

3SR, Heraeus, Osterode, Alemania) a 2.000 x g a +20 °C durante 15 minutos. Después de una etapa de filtración adicional (tamaño de poro de 0,45 µm, Sterivex-HV, Millipore, Cork, Irlanda), la mezcla de reacción se transfirió a dispositivos Centricon Plus-70 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) y centrifugación (Multifuge 3SR, Heraeus, Osterode, Alemania) se realizó a 3.000 x g a temperatura ambiente durante 15 minutos. SDS-PAGE demostró una reacción de escisión exitosa (datos no mostrados). El agotamiento de la tripsina se confirmó aplicando un sustrato cromogénico (datos no mostrados). Los fragmentos tripticos (concentración de proteína de aproximadamente 0,5 mg/ml) se concentraron en un sistema concentrador al vacío SpeedVac (Thermo Scientific, Langensfeld, Alemania) a una concentración final de aproximadamente 40 mg/ml. Finalmente, el perfil peptídico de los fragmentos concentrados de VWF se investigó mediante análisis por MS y se comparó con el perfil obtenido para la fracción intermedia antes del primer paso de centrifugación, proporcionando así evidencia de que ambas muestras tenían la misma composición de fragmentos de VWF.

3) Identificación de fragmentos tripticos de VWF que interactúan con CLEC10A

Para identificar cuáles de las cadenas de glucano presentes en VWF estaban involucradas en la interacción con CLEC10A, se incubaron fragmentos tripticos de VWF con CLEC10A soluble (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania). Se disolvió 1 mg de proteína receptora liofilizada en 2 ml de tampón de reacción que contenía HEPES 10 mM, NaCl 150 mM y CaCl₂ 5 mM a pH 7,4. Se ajustaron 20 ml de fragmentos concentrados de VWF después de la digestión con tripsina con un contenido de proteína de 0,5 mg/ml a las mismas condiciones de tampón mediante la adición de una solución madre concentrada de tampón 20 veces, y luego se mezclaron con la solución que contenía la proteína receptora. La incubación se llevó a cabo durante la noche a +37 °C bajo mezcla suave (Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Alemania). Posteriormente, los fragmentos de VWF no unidos se separaron por centrifugación (unidades de filtro centrifugo Amicon Ultra-15, NMWL 10 kDa, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) a 3.000 x g (Multifuge 3SR, Heraeus, Osterode, Alemania) y se descartaron. La centrifugación se realizó a temperatura ambiente hasta que se alcanzó un volumen restante de 0,5 ml. La mezcla de reacción concentrada que contenía la proteína receptora que interactúa con los fragmentos de VWF se lavó luego con tampón de reacción y se concentró nuevamente. Después de repetir esta etapa de lavado de la solución concentrada 2 veces, la mezcla de reacción se dividió en dos porciones iguales, que luego se trataron con dos tampones de elución diferentes. Por un lado, los fragmentos de proteínas unidas se eluyeron a pH 11 (tampón de glicina/NaOH 100 mM, pH 11,0), por otro, usando una solución que contenía GalNAc (GalNAc 100 mM, pH 4,3). El tampón de elución respectivo se añadió a la solución lavada y concentrada y la incubación se llevó a cabo durante la noche a temperatura ambiente con mezcla suave. Después de la separación por centrifugación, el filtrado resultante que contiene los fragmentos de VWF eluidos se recogió y analizó por MS.

4) Análisis de fragmentos tripticos de VWF que interactúan con el receptor de separación

Los fragmentos tripticos aislados se desglicosilaron por tratamiento con PNGasa F y eliminación β, y luego se analizaron aplicando ionización por electroaspersión por nanocromatografía líquida MS/MS. Además, los N- y O-glucanos libres fueron permitilados y caracterizados por análisis MALDI-TOF-MS. El análisis se realizó con base en procedimientos publicados (Canis et al. (2010) Journal of Thrombosis and Haemostasis, 8: 137-145; Canis et al. (2012) The Biochemical Journal, 447: 217-228).

Ejemplo 2: Generación de un vector de expresión para VWF mutante T2298

Se había generado previamente un plásmido de expresión que contenía una secuencia de ADNc de VWF de longitud completa en su sitio de clonación múltiple. La secuencia de ADNc de VWF contenida en este vector se muestra como SEQ ID NO: 1, su secuencia de proteína correspondiente como SEQ ID NO: 2.

Para generar tales vectores de expresión, el ADNc de VWF se amplificó por reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando el conjunto de cebadores VWF+ y VWF- (SEQ ID NO. 3 y 4) en condiciones estándar conocidas por los expertos en la técnica (y como se describe, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel FM et al. (eds.) John Wiley & Sons, Inc.; <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>) de un plásmido que contiene ADNc de VWF (tal como se puede obtener comercialmente, por ejemplo, pMT2-VWF de ATCC, No. 67122). El fragmento de PCR resultante se digirió mediante la endonucleasa de restricción EcoRI y se ligó al vector de expresión pIRESneo3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) que se había linealizado mediante EcoRI. El plásmido de expresión resultante con la orientación correcta del inserto contenía un ADNc de tipo salvaje de VWF corriente abajo del promotor CMV.

Para introducir mutaciones en la secuencia de VWF se aplicó mutagénesis dirigida al sitio (Kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange XL, Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos) en el plásmido descrito anteriormente de acuerdo con el siguiente protocolo sugerido por el fabricante del kit. Por reacción de mutagénesis 5 µl de 10x tampón de reacción, 1 µl de ADN plasmídico (50 ng), 1 µl (10 pmol/µl) de cada uno de los dos oligonucleótidos de mutagénesis respectivos We4781 y We4782 (SEQ ID NO. 5 y 6), 1 µl de dNTP Mix, 3 µl de Quick-Solution, 1 µl de Turbo Polimerase (2,5 U/µl) y 37 µl de H₂O se mezclaron y se sometieron a una reacción en cadena de la polimerasa con una desnaturalización inicial durante 2 minutos a 95 °C, 18 ciclos de a) desnaturalización durante 50 segundos a 95 °C, b) fusión durante 50 segundos a 60 °C y c) alargamiento durante 17 minutos a 68 °C, seguido de una única fase de alargamiento terminal de 7 minutos a 68 °C. Posteriormente se añadió 1 µl de enzima DpnI del kit y la reacción se incubó durante otros 60 minutos a 37 °C. Después de eso, 3 µl de la reacción de mutagénesis se sometieron a

transformación en *E. coli*. Se aislaron los clones, se extrajo el ADN plasmídico y se verificó la mutación en la secuencia de VWF mediante secuenciación de ADN.

5 Usando los protocolos y el plásmido descritos anteriormente y aplicando técnicas de biología molecular conocidas por los expertos en la técnica (y como se describe, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology*, *ibid*), el técnico puede preparar otros constructos para la mutación de otros residuos de aminoácidos.

Ejemplo 3: Generación de un vector de expresión para un fragmento de VWF fusionado con albúmina que contiene el residuo T2298

10 Con el fin de generar un vector de expresión para un fragmento de VWF que contiene los residuos de aminoácidos 2276 a 2326 fusionados a la albúmina humana, las secuencias de codificación para el fragmento de VWF que incluyen un péptido de señalización N-terminal y una glicina de 28 aminoácidos C-terminal el enlazador de serina se fabrican por síntesis génica (Eurofins MWG Synthesis, Ebersberg, Alemania) con un sitio de restricción NheI en el extremo 5' y un sitio BamH1 en el extremo 3'. Este fragmento se extrae del vector de clonación proporcionado por la digestión con NheI y BamH1, se purifica y se clona en el vector de expresión digerido con NheI/BamH1 pIRESneo3 (*ibid*).

15 La secuencia codificante de albúmina se amplifica por PCR. Para ello, 1 µl de ADNc de plásmido que contiene ADN de albúmina de tipo salvaje (50 ng), 5 µl de tampón de reacción 10x, 1 µl (10 pmol/µl) de cada uno de los dos cebadores de PCR respectivos HA+ y HA- (SEQ ID NO: 7 y 8), 1 µl de la mezcla dNTP, 1 µl de Turbo Polimerase (2.5 U/µl) y 40 µl de H₂O se mezclan y se someten a una reacción en cadena de la polimerasa con una desnaturalización inicial durante 2 minutos a 95 °C, 25 ciclos de a) desnaturalización durante 20 segundos a 95 °C, b) fusión durante 20 segundos a 61 °C y c) alargamiento durante 7 minutos a 68 °C, seguida de una única fase de alargamiento terminal de 7 minutos a 68 °C. El fragmento se purifica, se digiere con BamH1 y NotI y se liga a los sitios BamH1 y NotI del vector descrito anteriormente que contiene el fragmento de VWF. La mezcla de ligación se somete a transformación en *E. coli*. Se aíslan los clones, se extrae el ADN plasmídico y se verifica la secuencia mediante secuenciación del ADN. La secuencia de aminoácidos del constructo expresado se muestra en SEQ ID NO: 9.

Ejemplo 4: Transfección de plásmidos y expresión de mutantes de VWF en células CHO

25 Los plásmidos de expresión se cultivaron en *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y se purificaron usando protocolos estándar (Qiagen, Hilden, Alemania). Las células CHO K1 se transfectaron con plásmidos de expresión usando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Los clones individuales se aislaron y se hicieron crecer en medio sin suero (CD-CHO, Life Technologies) en presencia de 750 µg/ml de genitocina. Los clones se extendieron a través de matraces T en matraces de agitación y biorreactores de los que se recogieron los sobrenadantes para la purificación de la proteína VWF recombinante respectiva.

Ejemplo 5: Cuantificación del antígeno VWF

35 El antígeno VWF en el sobrenadante de cultivo se determinó mediante un ELISA cuyo rendimiento es conocido por los expertos en la materia. En resumen, las microplacas se incubaron con 100 µL por pozo del anticuerpo de captura (vWF-IgG anti-humano de conejo, Dako A0082 [Dako, Hamburgo, Alemania], diluido 1:2000 en tampón A [Sigma C3041, Sigma-Aldrich, Munich, Alemania]) durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas tres veces con tampón B (Sigma P3563), cada pozo se incubó con 200 µl de tampón C (Sigma P3688) durante 1,5 horas a temperatura ambiente (bloqueo). Después de otros tres pasos de lavado con el tampón B, las diluciones en serie de la muestra de prueba en el tampón B, así como las diluciones en serie de plasma humano estándar (ORKL21; 20-0,2 mU/mL; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania) en el tampón B (volúmenes por pozo: se incubaron 100 µL durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado con tampón B, se añadieron a cada pozo 100 µl de una dilución 1:16000 en tampón B del anticuerpo de detección (vWF-IgG anti-humano de conejo, Dako P0226, marcado con peroxidasa) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado con tampón B, se añadieron 100 µL de solución de sustrato (OUVF, Siemens Healthcare Diagnostics) por pozo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µL de dilución de detención sin diluir (OSFA, Siemens Healthcare Diagnostics) preparó las muestras para lectura en un lector de microplacas adecuado a una longitud de onda de 450 nm. Las concentraciones de las muestras de prueba se calcularon utilizando la curva estándar con plasma humano estándar como referencia.

Ejemplo 6: Análisis farmacocinético del mutante VWF T2298Q

50 El VWF-T2298Q del Ejemplo 4 y el VWF recombinante (tipo salvaje) se administran por vía intravenosa a un total de 4 ratas CD cada una. La dosis es de 100 U (VWF:Ag)/kg de peso corporal, a un volumen de inyección de 4 ml/kg.

55 Las muestras de sangre se extraen retroorbitalmente a rangos apropiados comenzando a los 5 minutos después de la aplicación de las sustancias de prueba, usando un esquema de muestreo alternativo, dando como resultado muestras de 2 animales/punto de tiempo (t=0, 5, 30, 90 min, 4h, 1d para el subconjunto Nr. 1 y 0, 15 min, 1, 2, 8 h y 2 d para el subconjunto Nr. 2). El esquema está diseñado para minimizar los posibles efectos del muestreo de sangre en la concentración plasmática que se cuantificará. La sangre se procesa en plasma y se almacena congelada hasta su análisis. El nivel de VWF:Ag en plasma se cuantifica posteriormente mediante un ELISA como se describe en el ejemplo 5. La concentración plasmática media se usa para calcular los parámetros farmacocinéticos.

Listado de secuencias

<110> CSL Behring Recombinant Facility AG

<120>Factor de von Willebrand modificado que tiene una semivida mejorada

5 <130> A241

<150> EP2015158065.1

<151> 2015-03-06

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

10 <210> 1

<211> 8442

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> CDS

<222> (1)..(8442)

<400> 1

ES 2 772 933 T3

atg att cct gcc aga ttt gcc ggg gtg ctg ctt gct ctg gcc ctc att	48
Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile	
1 5 10 15	
ttg cca ggg acc ctt tgt gca gaa gga act cgc ggc agg tca tcc acg	96
Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr	
20 25 30	
gcc cga tgc agc ctt ttc gga agt gac ttc gtc aac acc ttt gat ggg	144
Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly	
35 40 45	
agc atg tac agc ttt gcg gga tac tgc agt tac ctc ctg gca ggg ggc	192
Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly	
50 55 60	
tgc cag aaa cgc tcc ttc tcg att att ggg gac ttc cag aat ggc aag	240
Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys	
65 70 75 80	
aga gtg agc ctc tcc gtg tat ctt ggg gaa ttt ttt gac atc cat ttg	288
Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu	
85 90 95	
ttt gtc aat ggt acc gtg aca cag ggg gac caa aga gtc tcc atg ccc	336
Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro	
100 105 110	
tat gcc tcc aaa ggg ctg tat cta gaa act gag gct ggg tac tac aag	384
Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys	
115 120 125	
ctg tcc ggt gag gcc tat ggc ttt gtg gcc agg atc gat ggc agc ggc	432
Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly	
130 135 140	
aac ttt caa gtc ctg ctg tca gac aga tac ttc aac aag acc tgc ggg	480

ES 2 772 933 T3

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly	
145	150 155 160
ctg tgt ggc aac ttt aac atc ttt gct gaa gat gac ttt atg acc caa	528
Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln	
	165 170 175
gaa ggg acc ttg acc tcg gac cct tat gac ttt gcc aac tca tgg gct	576
Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala	
	180 185 190
ctg agc agt gga gaa cag tgg tgt gaa cgg gca tct cct ccc agc agc	624
Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser	
	195 200 205
tca tgc aac atc tcc tct ggg gaa atg cag aag gcc ctg tgg gag cag	672
Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln	
	210 215 220
tgc cag ctt ctg aag agc acc tcg gtg ttt gcc cgc tgc cac cct ctg	720
Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu	
	225 230 235 240
gtg gac ccc gag cct ttt gtg gcc ctg tgt gag aag act ttg tgt gag	768
Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu	
	245 250 255
tgt gct ggg ggg ctg gag tgc gcc tgc cct gcc ctc ctg gag tac gcc	816
Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala	
	260 265 270
cgg acc tgt gcc cag gag gga atg gtg ctg tac gcc tgg acc gac cac	864
Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His	
	275 280 285
agc gcg tgc agc cca gtg tgc cct gct ggt atg gag tat agg cag tgt	912
Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys	
	290 295 300
gtg tcc cct tgc gcc agg acc tgc cag agc ctg cac atc aat gaa atg	960
Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met	
	305 310 315 320
tgt cag gag cga tgc gtg gat ggc tgc agc tgc cct gag gga cag ctc	1008
Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu	
	325 330 335
ctg gat gaa ggc ctc tgc gtg gag agc acc gag tgt ccc tgc gtg cat	1056
Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His	
	340 345 350
tcc gga aag cgc tac cct ccc ggc acc tcc ctc tct cga gac tgc aac	1104
Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn	
	355 360 365
acc tgc att tgc cga aac agc cag tgg atc tgc agc aat gaa gaa tgt	1152
Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys	
	370 375 380
cca ggg gag tgc ctt gtc aca ggt caa tca cac ttc aag agc ttt gac	1200
Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp	
	385 390 395 400

ES 2 772 933 T3

aac aga tac ttc acc ttc agt ggg atc tgc cag tac ctg ctg gcc cgg 1248
 Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
 405 410 415

gat tgc cag gac cac tcc ttc tcc att gtc att gag act gtc cag tgt 1296
 Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
 420 425 430

gct gat gac cgc gac gct gtg tgc acc cgc tcc gtc acc gtc cgg ctg 1344
 Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
 435 440 445

cct ggc ctg cac aac agc ctt gtg aaa ctg aag cat ggg gca gga gtt 1392
 Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
 450 455 460

gcc atg gat ggc cag gac gtc cag ctc ccc ctc ctg aaa ggt gac ctc 1440
 Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
 465 470 475 480

cgc atc cag cat aca gtg acg gcc tcc gtg cgc ctc agc tac ggg gag 1488
 Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
 485 490 495

gac ctg cag atg gac tgg gat ggc cgc ggg agg ctg ctg gtg aag ctg 1536
 Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
 500 505 510

tcc ccc gtc tat gcc ggg aag acc tgc ggc ctg tgt ggg aat tac aat 1584
 Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
 515 520 525

ggc aac cag ggc gac gac ttc ctt acc ccc tct ggg ctg gcg gag ccc 1632
 Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
 530 535 540

cgg gtg gag gac ttc ggg aac gcc tgg aag ctg cac ggg gac tgc cag 1680
 Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
 545 550 555 560

gac ctg cag aag cag cac agc gat ccc tgc gcc ctc aac ccg cgc atg 1728
 Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
 565 570 575

acc agg ttc tcc gag gag gcg tgc gcg gtc ctg acg tcc ccc aca ttc 1776
 Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
 580 585 590

gag gcc tgc cat cgt gcc gtc agc ccg ctg ccc tac ctg cgg aac tgc 1824
 Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
 595 600 605

cgc tac gac gtg tgc tcc tgc tcg gac ggc cgc gag tgc ctg tgc gcc 1872
 Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
 610 615 620

gcc ctg gcc agc tat gcc gcg gcc tgc gcg ggg aga ggc gtg cgc gtc 1920
 Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
 625 630 635 640

gcg tgg cgc gag cca gcc cgc tgt gag ctg aac tgc ccg aaa ggc cag 1968
 Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
 645 650 655

ES 2 772 933 T3

gtg tac ctg cag tgc ggg acc ccc tgc aac ctg acc tgc cgc tct ctc Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu 660 665 670	2016
tct tac ccg gat gag gaa tgc aat gag gcc tgc ctg gag ggc tgc ttc Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe 675 680 685	2064
tgc ccc cca ggg ctc tac atg gat gag agg ggg gac tgc gtg ccc aag Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys 690 695 700	2112
gcc cag tgc ccc tgt tac tat gac ggt gag atc ttc cag cca gaa gac Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp 705 710 715 720	2160
atc ttc tca gac cat cac acc atg tgc tac tgt gag gat ggc ttc atg Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met 725 730 735	2208
cac tgt acc atg agt gga gtc ccc gga agc ttg ctg cct gac gct gtc His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val 740 745 750	2256
ctc agc agt ccc ctg tct cat cgc agc aaa agg agc cta tcc tgt cgg Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg 755 760 765	2304
ccc ccc atg gtc aag ctg gtg tgt ccc gct gac aac ctg cgg gct gaa Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu 770 775 780	2352
ggg ctc gag tgt acc aaa acg tgc cag aac tat gac ctg gag tgc atg Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met 785 790 795 800	2400
agc atg ggc tgt gtc tct ggc tgc ctc tgc ccc ccg ggc atg gtc cgg Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg 805 810 815	2448
cat gag aac aga tgt gtg gcc ctg gaa agg tgt ccc tgc ttc cat cag His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln 820 825 830	2496
ggc aag gag tat gcc cct gga gaa aca gtg aag att ggc tgc aac act Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr 835 840 845	2544
tgt gtc tgt cgg gac cgg aag tgg aac tgc aca gac cat gtg tgt gat Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp 850 855 860	2592
gcc acg tgc tcc acg atc ggc atg gcc cac tac ctc acc ttc gac ggg Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly 865 870 875 880	2640
ctc aaa tac ctg ttc ccc ggg gag tgc cag tac gtt ctg gtg cag gat Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp 885 890 895	2688
tac tgc ggc agt aac cct ggg acc ttt cgg atc cta gtg ggg aat aag Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys	2736

ES 2 772 933 T3

900	905	910	
gga tgc agc cac ccc tca gtg aaa tgc aag aaa cgg gtc acc atc ctg Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu 915 920 925			2784
gtg gag gga gga gag att gag ctg ttt gac ggg gag gtg aat gtg aag Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys 930 935 940			2832
agg ccc atg aag gat gag act cac ttt gag gtg gtg gag tct ggc cgg Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg 945 950 955 960			2880
tac atc att ctg ctg ctg ggc aaa gcc ctc tcc gtg gtc tgg gac cgc Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg 965 970 975			2928
cac ctg agc atc tcc gtg gtc ctg aag cag aca tac cag gag aaa gtg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val 980 985 990			2976
tgt ggc ctg tgt ggg aat ttt gat ggc atc cag aac aat gac ctc acc Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr 995 1000 1005			3024
agc agc aac ctc caa gtg gag gaa gac cct gtg gac ttt ggg aac Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn 1010 1015 1020			3069
tcc tgg aaa gtg agc tcg cag tgt gct gac acc aga aaa gtg cct Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro 1025 1030 1035			3114
ctg gac tca tcc cct gcc acc tgc cat aac aac atc atg aag cag Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln 1040 1045 1050			3159
acg atg gtg gat tcc tcc tgt aga atc ctt acc agt gac gtc ttc Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe 1055 1060 1065			3204
cag gac tgc aac aag ctg gtg gac ccc gag cca tat ctg gat gtc Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val 1070 1075 1080			3249
tgc att tac gac acc tgc tcc tgt gag tcc att ggg gac tgc gcc Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala 1085 1090 1095			3294
tgc ttc tgc gac acc att gct gcc tat gcc cac gtg tgt gcc cag Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln 1100 1105 1110			3339
cat ggc aag gtg gtg acc tgg agg acg gcc aca ttg tgc ccc cag His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln 1115 1120 1125			3384
agc tgc gag gag agg aat ctc cgg gag aac ggg tat gag tgt gag Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu 1130 1135 1140			3429
tgg cgc tat aac agc tgt gca cct gcc tgt caa gtc acg tgt cag			3474

ES 2 772 933 T3

Trp	Arg	Tyr	Asn	Ser	Cys	Ala	Pro	Ala	Cys	Gln	Val	Thr	Cys	Gln			
	1145					1150					1155						
cac	cct	gag	cca	ctg	gcc	tgc	cct	gtg	cag	tgt	gtg	gag	ggc	tgc			3519
His	Pro	Glu	Pro	Leu	Ala	Cys	Pro	Val	Gln	Cys	Val	Glu	Gly	Cys			
	1160					1165					1170						
cat	gcc	cac	tgc	cct	cca	ggg	aaa	atc	ctg	gat	gag	ctt	ttg	cag			3564
His	Ala	His	Cys	Pro	Pro	Gly	Lys	Ile	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln			
	1175					1180					1185						
acc	tgc	gtt	gac	cct	gaa	gac	tgt	cca	gtg	tgt	gag	gtg	gct	ggc			3609
Thr	Cys	Val	Asp	Pro	Glu	Asp	Cys	Pro	Val	Cys	Glu	Val	Ala	Gly			
	1190					1195					1200						
cgg	cgt	ttt	gcc	tca	gga	aag	aaa	gtc	acc	ttg	aat	ccc	agt	gac			3654
Arg	Arg	Phe	Ala	Ser	Gly	Lys	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Pro	Ser	Asp			
	1205					1210					1215						
cct	gag	cac	tgc	cag	att	tgc	cac	tgt	gat	gtt	gtc	aac	ctc	acc			3699
Pro	Glu	His	Cys	Gln	Ile	Gly	His	Cys	Asp	Val	Val	Asn	Leu	Thr			
	1220					1225					1230						
tgt	gaa	gcc	tgc	cag	gag	ccg	gga	ggc	ctg	gtg	gtg	cct	ccc	aca			3744
Cys	Glu	Ala	Cys	Gln	Glu	Pro	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Pro	Pro	Thr			
	1235					1240					1245						
gat	gcc	ccg	gtg	agc	ccc	acc	act	ctg	tat	gtg	gag	gac	atc	tcg			3789
Asp	Ala	Pro	Val	Ser	Pro	Thr	Thr	Leu	Tyr	Val	Glu	Asp	Ile	Ser			
	1250					1255					1260						
gaa	ccg	ccg	ttg	cac	gat	ttc	tac	tgc	agc	agg	cta	ctg	gac	ctg			3834
Glu	Pro	Pro	Leu	His	Asp	Phe	Tyr	Cys	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu			
	1265					1270					1275						
gtc	ttc	ctg	ctg	gat	ggc	tcc	tcc	agg	ctg	tcc	gag	gct	gag	ttt			3879
Val	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Phe			
	1280					1285					1290						
gaa	gtg	ctg	aag	gcc	ttt	gtg	gtg	gac	atg	atg	gag	cgg	ctg	cgc			3924
Glu	Val	Leu	Lys	Ala	Phe	Val	Val	Asp	Met	Met	Glu	Arg	Leu	Arg			
	1295					1300					1305						
atc	tcc	cag	aag	tgg	gtc	cgc	gtg	gcc	gtg	gtg	gag	tac	cac	gac			3969
Ile	Ser	Gln	Lys	Trp	Val	Arg	Val	Ala	Val	Val	Glu	Tyr	His	Asp			
	1310					1315					1320						
ggc	tcc	cac	gcc	tac	atc	ggg	ctc	aag	gac	cgg	aag	cga	ccg	tca			4014
Gly	Ser	His	Ala	Tyr	Ile	Gly	Leu	Lys	Asp	Arg	Lys	Arg	Pro	Ser			
	1325					1330					1335						
gag	ctg	cgg	cgc	att	gcc	agc	cag	gtg	aag	tat	gcg	ggc	agc	cag			4059
Glu	Leu	Arg	Arg	Ile	Ala	Ser	Gln	Val	Lys	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gln			
	1340					1345					1350						
gtg	gcc	tcc	acc	agc	gag	gtc	ttg	aaa	tac	aca	ctg	ttc	caa	atc			4104
Val	Ala	Ser	Thr	Ser	Glu	Val	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu	Phe	Gln	Ile			
	1355					1360					1365						
ttc	agc	aag	atc	gac	cgc	cct	gaa	gcc	tcc	cgc	atc	gcc	ctg	ctc			4149
Phe	Ser	Lys	Ile	Asp	Arg	Pro	Glu	Ala	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Leu			
	1370					1375					1380						

ES 2 772 933 T3

ctg atg gcc agc cag gag ccc caa cgg atg tcc cgg aac ttt gtc Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val 1385 1390 1395	4194
cgc tac gtc cag ggc ctg aag aag aag aag gtc att gtg atc ccg Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro 1400 1405 1410	4239
gtg ggc att ggg ccc cat gcc aac ctc aag cag atc cgc ctc atc Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile 1415 1420 1425	4284
gag aag cag gcc cct gag aac aag gcc ttc gtg ctg agc agt gtg Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val 1430 1435 1440	4329
gat gag ctg gag cag caa agg gac gag atc gtt agc tac ctc tgt Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys 1445 1450 1455	4374
gac ctt gcc cct gaa gcc cct cct cct act ctg ccc ccc cac atg Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met 1460 1465 1470	4419
gca caa gtc act gtg ggc ccg ggg ctc ttg ggg gtt tcg acc ctg Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu 1475 1480 1485	4464
ggg ccc aag agg aac tcc atg gtt ctg gat gtg gcg ttc gtc ctg Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu 1490 1495 1500	4509
gaa gga tcg gac aaa att ggt gaa gcc gac ttc aac agg agc aag Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys 1505 1510 1515	4554
gag ttc atg gag gag gtg att cag cgg atg gat gtg ggc cag gac Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp 1520 1525 1530	4599
agc atc cac gtc acg gtg ctg cag tac tcc tac atg gtg acc gtg Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val 1535 1540 1545	4644
gag tac ccc ttc agc gag gca cag tcc aaa ggg gac atc ctg cag Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln 1550 1555 1560	4689
cgg gtg cga gag atc cgc tac cag ggc ggc aac agg acc aac act Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr 1565 1570 1575	4734
ggg ctg gcc ctg cgg tac ctc tct gac cac agc ttc ttg gtc agc Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser 1580 1585 1590	4779
cag ggt gac cgg gag cag gcg ccc aac ctg gtc tac atg gtc acc Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr 1595 1600 1605	4824
gga aat cct gcc tct gat gag atc aag agg ctg cct gga gac atc Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile 1610 1615 1620	4869

ES 2 772 933 T3

cag gtg gtg ccc att gga gtg ggc cct aat gcc aac gtg cag gag Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu 1625 1630 1635	4914
ctg gag agg att ggc tgg ccc aat gcc cct atc ctc atc cag gac Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp 1640 1645 1650	4959
ttt gag acg ctc ccc cga gag gct cct gac ctg gtg ctg cag agg Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg 1655 1660 1665	5004
tgc tgc tcc gga gag ggg ctg cag atc ccc acc ctc tcc cct gca Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala 1670 1675 1680	5049
cct gac tgc agc cag ccc ctg gac gtg atc ctt ctc ctg gat ggc Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly 1685 1690 1695	5094
tcc tcc agt ttc cca gct tct tat ttt gat gaa atg aag agt ttc Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe 1700 1705 1710	5139
gcc aag gct ttc att tca aaa gcc aat ata ggg cct cgt ctc act Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr 1715 1720 1725	5184
cag gtg tca gtg ctg cag tat gga agc atc acc acc att gac gtg Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val 1730 1735 1740	5229
cca tgg aac gtg gtc ccg gag aaa gcc cat ttg ctg agc ctt gtg Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val 1745 1750 1755	5274
gac gtc atg cag cgg gag gga ggc ccc agc caa atc ggg gat gcc Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala 1760 1765 1770	5319
ttg ggc ttt gct gtg cga tac ttg act tca gaa atg cat ggg gcg Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala 1775 1780 1785	5364
cgc ccg gga gcc tca aag gcg gtg gtc atc ctg gtc acg gac gtc Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val 1790 1795 1800	5409
tct gtg gat tca gtg gat gca gca gct gat gcc gcc agg tcc aac Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn 1805 1810 1815	5454
aga gtg aca gtg ttc cct att gga att gga gat cgc tac gat gca Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala 1820 1825 1830	5499
gcc cag cta cgg atc ttg gca ggc cca gca ggc gac tcc aac gtg Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val 1835 1840 1845	5544
gtg aag ctc cag cga atc gaa gac ctc cct acc atg gtc acc ttg Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu 1850 1855 1860	5589

ES 2 772 933 T3

1850		1855		1860		
ggc aat tcc ttc ctc cac aaa ctg tgc tct gga ttt gtt agg att						5634
Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile						
1865		1870		1875		
tgc atg gat gag gat ggg aat gag aag agg ccc ggg gac gtc tgg						5679
Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp						
1880		1885		1890		
acc ttg cca gac cag tgc cac acc gtg act tgc cag cca gat ggc						5724
Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly						
1895		1900		1905		
cag acc ttg ctg aag agt cat cgg gtc aac tgt gac cgg ggg ctg						5769
Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu						
1910		1915		1920		
agg cct tcg tgc cct aac agc cag tcc cct gtt aaa gtg gaa gag						5814
Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu						
1925		1930		1935		
acc tgt ggc tgc cgc tgg acc tgc ccc tgc gtg tgc aca ggc agc						5859
Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser						
1940		1945		1950		
tcc act cgg cac atc gtg acc ttt gat ggg cag aat ttc aag ctg						5904
Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu						
1955		1960		1965		
act ggc agc tgt tct tat gtc cta ttt caa aac aag gag cag gac						5949
Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp						
1970		1975		1980		
ctg gag gtg att ctc cat aat ggt gcc tgc agc cct gga gca agg						5994
Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg						
1985		1990		1995		
cag ggc tgc atg aaa tcc atc gag gtg aag cac agt gcc ctc tcc						6039
Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser						
2000		2005		2010		
gtc gag ctg cac agt gac atg gag gtg acg gtg aat ggg aga ctg						6084
Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu						
2015		2020		2025		
gtc tct gtt cct tac gtg ggt ggg aac atg gaa gtc aac gtt tat						6129
Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr						
2030		2035		2040		
ggt gcc atc atg cat gag gtc aga ttc aat cac ctt ggt cac atc						6174
Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile						
2045		2050		2055		
ttc aca ttc act cca caa aac aat gag ttc caa ctg cag ctc agc						6219
Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser						
2060		2065		2070		
ccc aag act ttt gct tca aag acg tat ggt ctg tgt ggg atc tgt						6264
Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys						
2075		2080		2085		
gat gag aac gga gcc aat gac ttc atg ctg agg gat ggc aca gtc						6309

ES 2 772 933 T3

Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Met	Leu	Arg	Asp	Gly	Thr	Val		
2090						2095					2100					
acc	aca	gac	tgg	aaa	aca	ctt	gtt	cag	gaa	tgg	act	gtg	cag	cgg	6354	
Thr	Thr	Asp	Trp	Lys	Thr	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Thr	Val	Gln	Arg		
2105						2110					2115					
cca	ggg	cag	acg	tgc	cag	ccc	atc	ctg	gag	gag	cag	tgt	ctt	gtc	6399	
Pro	Gly	Gln	Thr	Cys	Gln	Pro	Ile	Leu	Glu	Glu	Gln	Cys	Leu	Val		
2120						2125					2130					
ccc	gac	agc	tcc	cac	tgc	cag	gtc	ctc	ctc	tta	cca	ctg	ttt	gct	6444	
Pro	Asp	Ser	Ser	His	Cys	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Ala		
2135						2140					2145					
gaa	tgc	cac	aag	gtc	ctg	gct	cca	gcc	aca	ttc	tat	gcc	atc	tgc	6489	
Glu	Cys	His	Lys	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	Thr	Phe	Tyr	Ala	Ile	Cys		
2150						2155					2160					
cag	cag	gac	agt	tgc	cac	cag	gag	caa	gtg	tgt	gag	gtg	atc	gcc	6534	
Gln	Gln	Asp	Ser	Cys	His	Gln	Glu	Gln	Val	Cys	Glu	Val	Ile	Ala		
2165						2170					2175					
tct	tat	gcc	cac	ctc	tgt	cgg	acc	aac	ggg	gtc	tgc	gtt	gac	tgg	6579	
Ser	Tyr	Ala	His	Leu	Cys	Arg	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	Val	Asp	Trp		
2180						2185					2190					
agg	aca	cct	gat	ttc	tgt	gct	atg	tca	tgc	cca	cca	tct	ctg	gtt	6624	
Arg	Thr	Pro	Asp	Phe	Cys	Ala	Met	Ser	Cys	Pro	Pro	Ser	Leu	Val		
2195						2200					2205					
tat	aac	cac	tgt	gag	cat	ggc	tgt	ccc	cgg	cac	tgt	gat	ggc	aac	6669	
Tyr	Asn	His	Cys	Glu	His	Gly	Cys	Pro	Arg	His	Cys	Asp	Gly	Asn		
2210						2215					2220					
gtg	agc	tcc	tgt	ggg	gac	cat	ccc	tcc	gaa	ggc	tgt	ttc	tgc	cct	6714	
Val	Ser	Ser	Cys	Gly	Asp	His	Pro	Ser	Glu	Gly	Cys	Phe	Cys	Pro		
2225						2230					2235					
cca	gat	aaa	gtc	atg	ttg	gaa	ggc	agc	tgt	gtc	cct	gaa	gag	gcc	6759	
Pro	Asp	Lys	Val	Met	Leu	Glu	Gly	Ser	Cys	Val	Pro	Glu	Glu	Ala		
2240						2245					2250					
tgc	act	cag	tgc	att	ggt	gag	gat	gga	gtc	cag	cac	cag	ttc	ctg	6804	
Cys	Thr	Gln	Cys	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly	Val	Gln	His	Gln	Phe	Leu		
2255						2260					2265					
gaa	gcc	tgg	gtc	ccg	gac	cac	cag	ccc	tgt	cag	atc	tgc	aca	tgc	6849	
Glu	Ala	Trp	Val	Pro	Asp	His	Gln	Pro	Cys	Gln	Ile	Cys	Thr	Cys		
2270						2275					2280					
ctc	agc	ggg	cgg	aag	gtc	aac	tgc	aca	acg	cag	ccc	tgc	ccc	acg	6894	
Leu	Ser	Gly	Arg	Lys	Val	Asn	Cys	Thr	Thr	Gln	Pro	Cys	Pro	Thr		
2285						2290					2295					
gcc	aaa	gct	ccc	acg	tgt	ggc	ctg	tgt	gaa	gta	gcc	cgc	ctc	cgc	6939	
Ala	Lys	Ala	Pro	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys	Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Arg		
2300						2305					2310					
cag	aat	gca	gac	cag	tgc	tgc	ccc	gag	tat	gag	tgt	gtg	tgt	gac	6984	
Gln	Asn	Ala	Asp	Gln	Cys	Cys	Pro	Glu	Tyr	Glu	Cys	Val	Cys	Asp		
2315						2320					2325					

ES 2 772 933 T3

cca gtg agc tgt gac ctg ccc	cca gtg cct cac tgt gaa cgt ggc	7029
Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro	Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly	
2330	2335 2340	
ctc cag ccc aca ctg acc aac	cct ggc gag tgc aga ccc aac ttc	7074
Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn	Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe	
2345	2350 2355	
acc tgc gcc tgc agg aag gag	gag tgc aaa aga gtg tcc cca ccc	7119
Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu	Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro	
2360	2365 2370	
tcc tgc ccc ccg cac cgt ttg	ccc acc ctt cgg aag acc cag tgc	7164
Ser Cys Pro Pro His Arg Leu	Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys	
2375	2380 2385	
tgt gat gag tat gag tgt gcc	tgc aac tgt gtc aac tcc aca gtg	7209
Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala	Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val	
2390	2395 2400	
agc tgt ccc ctt ggg tac ttg	gcc tca acc gcc acc aat gac tgt	7254
Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu	Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys	
2405	2410 2415	
ggc tgt acc aca acc acc tgc	ctt ccc gac aag gtg tgt gtc cac	7299
Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys	Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His	
2420	2425 2430	
cga agc acc atc tac cct gtg	ggc cag ttc tgg gag gag ggc tgc	7344
Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val	Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys	
2435	2440 2445	
gat gtg tgc acc tgc acc gac	atg gag gat gcc gtg atg ggc ctc	7389
Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp	Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu	
2450	2455 2460	
cgc gtg gcc cag tgc tcc cag	aag ccc tgt gag gac agc tgt cgg	7434
Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln	Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg	
2465	2470 2475	
tcg ggc ttc act tac gtt ctg	cat gaa ggc gag tgc tgt gga agg	7479
Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu	His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg	
2480	2485 2490	
tgc ctg cca tct gcc tgt gag	gtg gtg act ggc tca ccg cgg ggg	7524
Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu	Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly	
2495	2500 2505	
gac tcc cag tct tcc tgg aag	agt gtc ggc tcc cag tgg gcc tcc	7569
Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys	Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser	
2510	2515 2520	
ccg gag aac ccc tgc ctc atc	aat gag tgt gtc cga gtg aag gag	7614
Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile	Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu	
2525	2530 2535	
gag gtc ttt ata caa caa agg	aac gtc tcc tgc ccc cag ctg gag	7659
Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg	Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu	
2540	2545 2550	
gtc cct gtc tgc ccc tcg ggc	ttt cag ctg agc tgt aag acc tca	7704
Val Pro Val Cys Pro Ser Gly	Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser	
2555	2560 2565	

ES 2 772 933 T3

gcg tgc tgc cca agc tgt cgc tgt gag cgc atg gag gcc tgc atg 7749
Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met
2570 2575 2580

ctc aat ggc act gtc att ggg ccc ggg aag act gtg atg atc gat 7794
Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp
2585 2590 2595

gtg tgc acg acc tgc cgc tgc atg gtg cag gtg ggg gtc atc tct 7839
Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser
2600 2605 2610

gga ttc aag ctg gag tgc agg aag acc acc tgc aac ccc tgc ccc 7884
Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro
2615 2620 2625

ctg ggt tac aag gaa gaa aat aac aca ggt gaa tgt tgt ggg aga 7929
Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg
2630 2635 2640

tgt ttg cct acg gct tgc acc att cag cta aga gga gga cag atc 7974
Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile
2645 2650 2655

atg aca ctg aag cgt gat gag acg ctc cag gat ggc tgt gat act 8019
Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr
2660 2665 2670

cac ttc tgc aag gtc aat gag aga gga gag tac ttc tgg gag aag 8064
His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys
2675 2680 2685

agg gtc aca ggc tgc cca ccc ttt gat gaa cac aag tgt ctg gct 8109
Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala
2690 2695 2700

gag gga ggt aaa att atg aaa att cca ggc acc tgc tgt gac aca 8154
Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr
2705 2710 2715

tgt gag gag cct gag tgc aac gac atc act gcc agg ctg cag tat 8199
Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr
2720 2725 2730

gtc aag gtg gga agc tgt aag tct gaa gta gag gtg gat atc cac 8244
Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His
2735 2740 2745

tac tgc cag ggc aaa tgt gcc agc aaa gcc atg tac tcc att gac 8289
Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp
2750 2755 2760

atc aac gat gtg cag gac cag tgc tcc tgc tgc tct ccg aca cgg 8334
Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg
2765 2770 2775

acg gag ccc atg cag gtg gcc ctg cac tgc acc aat ggc tct gtt 8379
Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val
2780 2785 2790

gtg tac cat gag gtt ctc aat gcc atg gag tgc aaa tgc tcc ccc 8424
Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro

<210> 2

<211> 2813

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 772 933 T3

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser

ES 2 772 933 T3

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

ES 2 772 933 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 772 933 T3

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
835 840 845

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 772 933 T3

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

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

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

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

Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro
 1025 1030 1035

Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln
 1040 1045 1050

Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe
 1055 1060 1065

Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
 1070 1075 1080

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala
 1085 1090 1095

Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln
 1100 1105 1110

His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln
 1115 1120 1125

Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu
 1130 1135 1140

Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln
 1145 1150 1155

His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys
 1160 1165 1170

His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln
 1175 1180 1185

Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly

ES 2 772 933 T3

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

ES 2 772 933 T3

Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val
 1430 1435 1440
 Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys
 1445 1450 1455
 Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met
 1460 1465 1470
 Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu
 1475 1480 1485
 Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu
 1490 1495 1500
 Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys
 1505 1510 1515
 Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp
 1520 1525 1530
 Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val
 1535 1540 1545
 Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln
 1550 1555 1560
 Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr
 1565 1570 1575
 Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser
 1580 1585 1590
 Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr
 1595 1600 1605
 Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile
 1610 1615 1620
 Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu
 1625 1630 1635
 Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp
 1640 1645 1650
 Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg
 1655 1660 1665

ES 2 772 933 T3

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

ES 2 772 933 T3

Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu
 1910 1915 1920

Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu
 1925 1930 1935

Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser
 1940 1945 1950

Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu
 1955 1960 1965

Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp
 1970 1975 1980

Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg
 1985 1990 1995

Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser
 2000 2005 2010

Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu
 2015 2020 2025

Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr
 2030 2035 2040

Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile
 2045 2050 2055

Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser
 2060 2065 2070

Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys
 2075 2080 2085

Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val
 2090 2095 2100

Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg
 2105 2110 2115

Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys Leu Val
 2120 2125 2130

Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala

ES 2 772 933 T3

2135						2140						2145			
Glu	Cys	His	Lys	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	Thr	Phe	Tyr	Ala	Ile	Cys	
2150						2155					2160				
Gln	Gln	Asp	Ser	Cys	His	Gln	Glu	Gln	Val	Cys	Glu	Val	Ile	Ala	
2165						2170					2175				
Ser	Tyr	Ala	His	Leu	Cys	Arg	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	Val	Asp	Trp	
2180						2185					2190				
Arg	Thr	Pro	Asp	Phe	Cys	Ala	Met	Ser	Cys	Pro	Pro	Ser	Leu	Val	
2195						2200					2205				
Tyr	Asn	His	Cys	Glu	His	Gly	Cys	Pro	Arg	His	Cys	Asp	Gly	Asn	
2210						2215					2220				
Val	Ser	Ser	Cys	Gly	Asp	His	Pro	Ser	Glu	Gly	Cys	Phe	Cys	Pro	
2225						2230					2235				
Pro	Asp	Lys	Val	Met	Leu	Glu	Gly	Ser	Cys	Val	Pro	Glu	Glu	Ala	
2240						2245					2250				
Cys	Thr	Gln	Cys	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly	Val	Gln	His	Gln	Phe	Leu	
2255						2260					2265				
Glu	Ala	Trp	Val	Pro	Asp	His	Gln	Pro	Cys	Gln	Ile	Cys	Thr	Cys	
2270						2275					2280				
Leu	Ser	Gly	Arg	Lys	Val	Asn	Cys	Thr	Thr	Gln	Pro	Cys	Pro	Thr	
2285						2290					2295				
Ala	Lys	Ala	Pro	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys	Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	
2300						2305					2310				
Gln	Asn	Ala	Asp	Gln	Cys	Cys	Pro	Glu	Tyr	Glu	Cys	Val	Cys	Asp	
2315						2320					2325				
Pro	Val	Ser	Cys	Asp	Leu	Pro	Pro	Val	Pro	His	Cys	Glu	Arg	Gly	
2330						2335					2340				
Leu	Gln	Pro	Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Gly	Glu	Cys	Arg	Pro	Asn	Phe	
2345						2350					2355				
Thr	Cys	Ala	Cys	Arg	Lys	Glu	Glu	Cys	Lys	Arg	Val	Ser	Pro	Pro	
2360						2365					2370				

ES 2 772 933 T3

Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys
 2375 2380 2385

Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val
 2390 2395 2400

Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys
 2405 2410 2415

Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His
 2420 2425 2430

Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys
 2435 2440 2445

Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu
 2450 2455 2460

Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg
 2465 2470 2475

Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg
 2480 2485 2490

Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly
 2495 2500 2505

Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser
 2510 2515 2520

Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu
 2525 2530 2535

Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu
 2540 2545 2550

Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser
 2555 2560 2565

Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met
 2570 2575 2580

Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp
 2585 2590 2595

Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser
 2600 2605 2610

ES 2 772 933 T3

Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro
2615 2620 2625

Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg
2630 2635 2640

Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile
2645 2650 2655

Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr
2660 2665 2670

His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys
2675 2680 2685

Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala
2690 2695 2700

Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr
2705 2710 2715

Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr
2720 2725 2730

Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His
2735 2740 2745

Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp
2750 2755 2760

Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg
2765 2770 2775

Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val
2780 2785 2790

Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro
2795 2800 2805

Arg Lys Cys Ser Lys
2810

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> PCR cebador VWF+

 <400> 3
 ttcgaattcc cgcagccctc attgcaggg 30

 5 <210> 4
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 10 <223> PCR cebador VWF-

 <400> 4
 tccgaattcc ggcagcagca ggcacccatg c 31

 15 <210> 4
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> PCR cebador VWF-<400> 4
 tccgaattcc ggcagcagca ggcacccatg c 31

 20 <210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223>PCR cebador VWFT2298Q+

 <400> 5
 gcagccctgc ccccaggcca aagctccac 30

 30 <210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> PCR cebador VWFT2298Q-

 35 <400> 6
 gtgggagctt tggcctgggg gcagggctgc 30

 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> PCR cebador HA+

 <400> 7
 ggatccgatg cacacaagag tgaggttg 28

 45 <210> 8
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> PCR cebador HA-

 50 <400> 8
 cgggccgctc ataagcctaa ggcagcttga c 31

ES 2 772 933 T3

<210> 9
<211> 686
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Péptido de señalización (1-22); Fragmento de VWF aa 2276 a 2326 (23-73); enlazador de glicina/serina (74-101); albúmina (102-686)
<400> 9

ES 2 772 933 T3

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys Leu Ser
 20 25 30

Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr Ala Lys Ala
 35 40 45

Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn Ala Asp
 50 55 60

Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 65 70 75 80

Ser Gly Gly Ser
 85 90 95

Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe
 100 105 110

Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe
 115 120 125

Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val
 130 135 140

Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala
 145 150 155 160

Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
 165 170 175

Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys
 180 185 190

Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp

ES 2 772 933 T3

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

ES 2 772 933 T3

Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
 450 455 460

Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
 465 470 475 480

Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
 485 490 495

Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
 500 505 510

Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
 515 520 525

Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
 530 535 540

Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
 545 550 555 560

Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
 565 570 575

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

Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
 595 600 605

Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
 610 615 620

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
 625 630 635 640

Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
 645 650 655

Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
 660 665 670

Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 675 680 685

ES 2 772 933 T3

<210> 10
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Dominio C1 de VWF modificado que tiene una mutación en T2298

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (44)..(44)

10 <223> Xaa está ausente o es un aminoácido distinto de la treonina y la serina

<400> 10

Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu Glu Ala
 1 5 10 15

Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys Leu Ser Gly
 20 25 30

Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Xaa Ala Lys Ala Pro
 35 40 45

Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln
 50 55 60

Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp
 65 70

<210> 11
 <211> 2050
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Forma madura de VWF modificado que tiene una mutación de T2298

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1535)..(1535)

20 <223> Xaa está ausente o es un aminoácido distinto de la treonina y la serina

<400> 11

ES 2 772 933 T3

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
1 5 10 15

Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr
20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro
35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys
50 55 60

ES 2 772 933 T3

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys
65 70 75 80

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

Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr
100 105 110

Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr
115 120 125

Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile
130 135 140

Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys
145 150 155 160

Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly
165 170 175

Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val
180 185 190

Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser
195 200 205

Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr
210 215 220

Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln
225 230 235 240

Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val
245 250 255

Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg
260 265 270

Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met
275 280 285

Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val
290 295 300

Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val

ES 2 772 933 T3

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu
565 570 575

Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala
580 585 590

Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys
595 600 605

Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Leu Met Ala Ser
610 615 620

Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly
625 630 635 640

Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His
645 650 655

Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn
660 665 670

Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp
675 680 685

Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro
690 695 700

Thr Leu Pro Pro His Met Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu
705 710 715 720

Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val
725 730 735

Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn
740 745 750

Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly
755 760 765

Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr
770 775 780

Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln
785 790 795 800

Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly
805 810 815

ES 2 772 933 T3

Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly
 820 825 830
 Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro
 835 840 845
 Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro
 850 855 860
 Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly
 865 870 875 880
 Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg
 885 890 895
 Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu
 900 905 910
 Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp
 915 920 925
 Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe
 930 935 940
 Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile
 945 950 955 960
 Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr
 965 970 975
 Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu
 980 985 990
 Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly
 995 1000 1005
 Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His
 1010 1015 1020
 Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr
 1025 1030 1035
 Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg
 1040 1045 1050
 Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr
 1055 1060 1065

ES 2 772 933 T3

Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser
 1070 1075 1080
 Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val
 1085 1090 1095
 Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val
 1100 1105 1110
 Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp
 1115 1120 1125
 Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro
 1130 1135 1140
 Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg
 1145 1150 1155
 Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val
 1160 1165 1170
 Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr
 1175 1180 1185
 Gly Ser Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe
 1190 1195 1200
 Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu
 1205 1210 1215
 Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly
 1220 1225 1230
 Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala
 1235 1240 1245
 Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly
 1250 1255 1260
 Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn
 1265 1270 1275
 Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly
 1280 1285 1290
 His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln

ES 2 772 933 T3

1295						1300							1305	
Leu	Ser	Pro	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser	Lys	Thr	Tyr	Gly	Leu	Cys	Gly
1310						1315					1320			
Ile	Cys	Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Met	Leu	Arg	Asp	Gly
1325						1330					1335			
Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Trp	Lys	Thr	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Thr	Val
1340						1345					1350			
Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Thr	Cys	Gln	Pro	Ile	Leu	Glu	Glu	Gln	Cys
1355						1360					1365			
Leu	Val	Pro	Asp	Ser	Ser	His	Cys	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu
1370						1375					1380			
Phe	Ala	Glu	Cys	His	Lys	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	Thr	Phe	Tyr	Ala
1385						1390					1395			
Ile	Cys	Gln	Gln	Asp	Ser	Cys	His	Gln	Glu	Gln	Val	Cys	Glu	Val
1400						1405					1410			
Ile	Ala	Ser	Tyr	Ala	His	Leu	Cys	Arg	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	Val
1415						1420					1425			
Asp	Trp	Arg	Thr	Pro	Asp	Phe	Cys	Ala	Met	Ser	Cys	Pro	Pro	Ser
1430						1435					1440			
Leu	Val	Tyr	Asn	His	Cys	Glu	His	Gly	Cys	Pro	Arg	His	Cys	Asp
1445						1450					1455			
Gly	Asn	Val	Ser	Ser	Cys	Gly	Asp	His	Pro	Ser	Glu	Gly	Cys	Phe
1460						1465					1470			
Cys	Pro	Pro	Asp	Lys	Val	Met	Leu	Glu	Gly	Ser	Cys	Val	Pro	Glu
1475						1480					1485			
Glu	Ala	Cys	Thr	Gln	Cys	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly	Val	Gln	His	Gln
1490						1495					1500			
Phe	Leu	Glu	Ala	Trp	Val	Pro	Asp	His	Gln	Pro	Cys	Gln	Ile	Cys
1505						1510					1515			
Thr	Cys	Leu	Ser	Gly	Arg	Lys	Val	Asn	Cys	Thr	Thr	Gln	Pro	Cys
1520						1525					1530			

ES 2 772 933 T3

Pro Xaa Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg
 1535 1540 1545

Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val
 1550 1555 1560

Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu
 1565 1570 1575

Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro
 1580 1585 1590

Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser
 1595 1600 1605

Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr
 1610 1615 1620

Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser
 1625 1630 1635

Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn
 1640 1645 1650

Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys
 1655 1660 1665

Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu
 1670 1675 1680

Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met
 1685 1690 1695

Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser
 1700 1705 1710

Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys
 1715 1720 1725

Gly Arg Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro
 1730 1735 1740

Arg Gly Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp
 1745 1750 1755

Ala Ser Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val
 1760 1765 1770

ES 2 772 933 T3

Lys Glu Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln
 1775 1780 1785

Leu Glu Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys
 1790 1795 1800

Thr Ser Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala
 1805 1810 1815

Cys Met Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met
 1820 1825 1830

Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val
 1835 1840 1845

Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro
 1850 1855 1860

Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys
 1865 1870 1875

Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly
 1880 1885 1890

Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys
 1895 1900 1905

Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp
 1910 1915 1920

Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys
 1925 1930 1935

Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys
 1940 1945 1950

Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu
 1955 1960 1965

Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp
 1970 1975 1980

Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser
 1985 1990 1995

Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro
 2000 2005 2010

ES 2 772 933 T3

Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly
2015 2020 2025

Ser Val Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys
2030 2035 2040

Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys
2045 2050

<210> 12

<211> 1444

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> FVIII cadena sencilla

<400> 12

ES 2 772 933 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 772 933 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 772 933 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro

ES 2 772 933 T3

Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe
 915 920 925

Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys
 930 935 940

Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His
 945 950 955 960

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn
 965 970 975

Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe
 980 985 990

Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu
 995 1000 1005

Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr
 1010 1015 1020

Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met
 1025 1030 1035

Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg
 1040 1045 1050

Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile
 1055 1060 1065

His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr
 1070 1075 1080

Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val
 1085 1090 1095

Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu
 1100 1105 1110

Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val
 1115 1120 1125

Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His
 1130 1135 1140

Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp
 1145 1150 1155

ES 2 772 933 T3

Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala
 1160 1165 1170

Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu
 1175 1180 1185

Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln
 1190 1195 1200

Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser
 1205 1210 1215

Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly
 1220 1225 1230

Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys
 1235 1240 1245

His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu
 1250 1255 1260

His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu
 1265 1270 1275

Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu
 1280 1285 1290

Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe
 1295 1300 1305

Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His
 1310 1315 1320

Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro
 1325 1330 1335

Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr
 1340 1345 1350

Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr
 1355 1360 1365

Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp
 1370 1375 1380

Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn
 1385 1390 1395

ES 2 772 933 T3

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

Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln
1415 1420 1425

Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu
1430 1435 1440

Tyr

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula humana del factor de von Willebrand (VWF) capaz de unirse al Factor VIII que comprende un dominio C1 que carece de un sitio de O-glicosilación en la posición de aminoácido 2298 para su uso en el tratamiento de un trastorno de la coagulación sanguínea, en el que dicho trastorno de la coagulación sanguínea es hemofilia A o enfermedad de von Willebrand y teniendo la molécula de VWF una eliminación reducida *in vivo* en comparación con el VWF derivado de plasma nativo.
2. La molécula de VWF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sitio de O-glicosilación en la posición 2298 presente en VWF nativo se ha inactivado eliminando o sustituyendo uno o más aminoácidos en las posiciones 2292 a 2303 de la secuencia de aminoácidos de VWF.
- 10 3. La molécula de VWF para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la treonina en la posición 2298 se ha eliminado o sustituido con un aminoácido distinto de la treonina y la serina.
4. La molécula de VWF para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho aminoácido distinto de treonina y serina se selecciona del grupo que consiste en glicina, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina.
- 15 5. La molécula de VWF para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10.
6. La molécula de VWF para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 11.
- 20 7. La molécula de VWF para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que una prolina en la posición 2295, 2297 o 2302 se ha eliminado o sustituido con un aminoácido diferente.
8. La molécula de VWF para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es capaz de aumentar la semivida del Factor VIII coadministrado con dicha molécula de VWF, en comparación con la semivida del Factor VIII coadministrado con VWF derivado de plasma nativo.
- 25 9. La molécula de VWF para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho tratamiento comprende además administrar una molécula de Factor VIII.
10. La molécula de VWF para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha molécula de VWF y dicha molécula de Factor VIII se administran por separado.
11. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de VWF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 30 12. Un kit farmacéutico que comprende (i) la molécula de VWF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y (ii) una molécula de Factor VIII.
13. El kit farmacéutico de la reivindicación 12, en el que dicha molécula de VWF y dicha molécula de Factor VIII están contenidas en composiciones separadas.
- 35 14. Un kit farmacéutico que comprende (i) la molécula de VWF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y (ii) una molécula de Factor VIII, para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre.
15. La molécula de VWF para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la semivida del factor VIII está aumentada *in vivo*.

Figura 1



