

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 318**

51 Int. Cl.:

A61P 7/02 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2016 PCT/EP2016/082629**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017 WO17109212**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2016 E 16826344 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3393583**

54 Título: **Glicoproteína V soluble para el tratamiento de enfermedades trombóticas**

30 Prioridad:

23.12.2015 EP 15202530

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

11.02.2021

73 Titular/es:

**JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITAET
WUERZBURG (100.0%)
Am Sanderring 2
97070 Wuerzburg, DE**

72 Inventor/es:

**NIESWANDT, BERNHARD;
BECK, SARAH y
STEGNER, DAVID**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 805 318 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

Glicoproteína V soluble para el tratamiento de enfermedades trombóticas

5 Antecedentes

La activación plaquetaria y la posterior formación de trombos en sitios de lesiones vasculares es crucial para la hemostasia normal, pero también puede causar infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (Coughlin SR. Nature. 2000; 407: 258-64). La adhesión y activación plaquetaria es un proceso de múltiples etapas que involucra múltiples interacciones receptor de plaquetas-ligando. Tras la lesión de la pared de un vaso, las plaquetas circulantes se desaceleran rápidamente por interacciones transitorias del complejo de glicoproteína (GP) Ib-V-IX con el factor de von Willebrand (vWF) inmovilizado sobre la matriz extracelular subendotelial expuesta (por ejemplo, en colágeno) (Shapiro MJ, et al., The Journal of Biological Chemistry, 2000; 275: 25216-21). Esta interacción retiene las plaquetas cerca de la pared del vaso y facilita el contacto entre GPVI y colágeno (Nieswandt B, et al. Blood. 2003; 102: 449-61). Las interacciones GPVI-colágeno inducen una cascada de señalización intracelular que conduce a la activación plaquetaria y la liberación de agonistas plaquetarios secundarios, tales como el tromboxano A₂ (TxA₂) y el difosfato de adenosina (ADP). Estos agonistas solubles junto con la trombina producida localmente contribuyen aún más a la activación plaquetaria a través de receptores acoplados a la proteína G (G_i, G_q, G_{12/13}) (Offermanns S. Circulation Research. 2006; 99: 1293-304). Todas estas vías de señalización se sinergizan para inducir respuestas celulares complejas, tales como la activación de integrinas, la liberación de contenidos granulados y la provisión de una superficie procoagulante para la activación de la cascada de coagulación (Nakanishi-Matsui M, et al., Nature. 2000; 404: 609-13; Cunningham MA, et al., The Journal of experimental medicine. 2000; 191: 455-62). El trombo final está incrustado en una red de fibrina para resistir las fuerzas de corte generadas por el flujo sanguíneo. La estabilización de un trombo recién formado es esencial para detener el sangrado en los sitios de lesión vascular. Sin embargo, si este proceso ocurre de manera incontrolada, también puede provocar eventos trombóticos que causan estados de enfermedad potencialmente mortales, tales como infarto de miocardio o accidente cerebrovascular isquémico. En consecuencia, los fármacos antiplaquetarios y anticoagulantes, utilizados solos o en combinación, son de gran importancia en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares (May F, et al., Blood. 2009; 114: 3464-72; Schroder J, et al., Mol Cell Biol. 2009; 29: 1083-94; Braun A, et al., Blood. 2009; 113: 2056-63). Si bien las terapias antiplaquetarias actuales reducen la recurrencia de los eventos vasculares, el mayor riesgo de sangrado debido a la inhibición plaquetaria es una preocupación particular para los pacientes que han experimentado un accidente cerebrovascular, y un subconjunto adicional de pacientes sigue siendo refractario a los enfoques antiplaquetarios (Pleines I, et al., Pflugers Archiv: European Journal of Physiology. 2009; 457: 1173-85), subrayando la necesidad de nuevas estrategias antiplaquetarias.

Su papel central en la adhesión de plaquetas pone dos complejos receptores en el foco de la investigación de plaquetas: i) el complejo GPIb-V-IX que interactúa con el vWF inmovilizado en la pared del vaso lesionado o en las plaquetas activadas y por lo tanto recluta plaquetas del torrente sanguíneo a la superficie reactiva en condiciones de cizallamiento elevado. ii) GPIIb/IIIa (integrina αIIbβ3), un receptor para fibrinógeno y vWF que requiere activación de adentro hacia afuera mediada por receptores agonistas, contribuye a la adhesión firme de plaquetas resistente al cizallamiento y es esencial para la formación de agregados. El complejo GPIb-V-IX está compuesto por 4 GP transmembrana relacionadas: GPIbα, GPIbβ, GPV y GPIX, que están asociadas en una estequiometría de 2:4:2:1 (Luo SZ et al., Blood. 2007; 109 (2): 603-9). Dentro de este complejo, GPIbα y GPIbβ están unidos por disulfuro y están asociados de forma no covalente con GPIX. GPV se asocia de forma no covalente con GPIb-IX (Nieswandt B, et al., Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2009; 7: 206-9). Se encuentran aproximadamente 30.000 copias del complejo GPIb-IX en la superficie de las plaquetas humanas (Varga-Szabo D, et al., Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2009; 7: 1057-66). La pérdida de la función de GPIb-V-IX causa el síndrome de Bernard-Soulier (BSS), un trastorno hemorrágico grave. El BSS se caracteriza por plaquetas circulantes gigantes anormales con adhesión defectuosa al vWF y capacidad de respuesta reducida a la trombina (Canobbio I, et al., Cellular Signaling. 2004; 16: 1329-44). Si bien la falta o la disfunción de GPIb o GPIX se asocian con BSS, no se ha informado de ninguna mutación de pérdida de función en GP5 y la falta de GPV en ratones no conduce a un fenotipo BSS (Ramakrishnan V, et al. PNAS. 1999; 96: 13336-41; Kahn ML, et al. Blood. 1999; 94: 4112-21). GPV es la única subunidad que no se requiere para la correcta expresión del complejo (Dong J, et al., Journal of Biological Chemistry. 1998; 273: 31449-54). Los documentos WO 95/02054 A2, US 6.005.089 y Lanza F, et al., Journal of Biological Chemistry. 1993; 268: 20801-20807 divulgan la secuencia y estructura del gen de GPV humana y la secuencia de aminoácidos de la GPV humana. GPV está altamente glicosilada y contiene un sitio de escisión de trombina que conduce a la eliminación cuantitativa de GPV de la superficie de las plaquetas y la generación de GPV soluble (sGPV) en presencia de trombina (Ravanat C, et al. Blood. 1997; 89: 3253-62; Azorsa DO, et al., Thrombosis and Haemostasis. 1999; 81: 131-8; White GC, et al., Thrombosis Research. 38: 641-648). La GPV humana soluble generada por la escisión de trombina tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10. Es de destacar que este sitio de escisión de trombina se conserva en la proteína de ratón, rata y humano (Ravanat C, et al., Blood. 1997; 89: 3253-62). Sin embargo, a diferencia de los ratones deficientes en el receptor 4 activado por proteasa (PAR), que no responde a la estimulación de trombina (Kahn ML, et al., Blood. 1999; 94: 4112-21; Kahn ML, et al., Nature. 1998; 394: 690-4), los ratones *Gp5^{Δ/Δ}* muestran una funcionalidad plaquetaria extremadamente normal. Además de la trombina, la GPV puede, como GPIbα o GPVI, ser escindida por sheddasas de la familia de desintegrina a y metaloproteinasas (ADAM), especialmente ADAM17 (también conocida como la enzima convertidora

del factor de necrosis tumoral, TACE) y ADAM10 (Garton KJ, et al., Journal of Biological Chemistry. 2001; 276: 37993-8001; Gardiner EE, et al., Blood. 2004; 104: 3611-7; Bergmeier W, et al., Thrombosis and Haemostasis. 2004; 91: 951-8), lo que resulta en una variante ligeramente más larga de sGPV. Sin embargo, la trombina se considera como el principal regulador de la expresión superficial de GPV. Los niveles de sGPV difieren enormemente entre plasma y suero ($17,3 \pm 6,3$ ng/ml frente a $1,2 \pm 0,17$ µg/ml, respectivamente) (Azorsa DO, et al., Thrombosis and Haemostasis. 1999; 81: 131-8) y los niveles de sGPV son ligeramente elevados bajo ciertas condiciones patológicas, tal como el accidente cerebrovascular isquémico ($39,4$ ng/ml en comparación con $28,1$ ng/ml en los controles) (Wolff V, et al., Stroke. 2005; 36: e17-9). Hasta la fecha, no se ha descrito ningún papel para sGPV en la trombosis o la hemostasia.

Sumario de la invención

Los inventores encontraron sorprendentemente que la GPV soluble tiene un efecto antitrombótico, sin afectar el tiempo de sangrado. Por lo tanto, la presente invención proporciona un agente antitrombótico que comprende GPV soluble. La presente invención se refiere a las siguientes realizaciones (1) a (34):

(1) Un polipéptido soluble que comprende una glicoproteína V (GPV) modificada que carece de un dominio transmembrana funcional para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad trombótica en un sujeto, dicho tratamiento y/o prevención comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de dicho polipéptido soluble, en el que el polipéptido soluble es incapaz de integrarse en una membrana celular a través de dicho dominio transmembrana, en el que el término GPV denota una proteína que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3.

(2) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con el punto (1), en el que la enfermedad trombótica se selecciona del grupo que consiste en afecciones tromboinflamatorias, trombosis venosa, trombosis arterial, trombosis capilar, trombosis de la vena porta, trombosis de la vena renal, trombosis de la vena yugular, trombosis del seno venoso cerebral, formación de trombos durante o después del contacto de la sangre con una superficie artificial, en particular oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO), aterosclerosis, artritis, coagulopatía, trombosis venosa profunda (DVT), coagulopatía intravascular diseminada (DIC), tromboembolismo crónica o agudo, tromboembolia pulmonar, síndrome de Budd-Chiari, enfermedades de Paget-Schroetter, accidente cerebrovascular e infarto de miocardio.

(3) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha GPV modificada es una GPV truncada.

(4) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha GPV modificada o GPV truncada consiste en un fragmento del dominio extracelular de una GPV nativa, dicho fragmento tiene una longitud de al menos 6 aminoácidos.

(5) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha GPV modificada o GPV truncada consiste en un fragmento del dominio extracelular de una GPV nativa, dicho fragmento tiene una longitud de al menos 8 aminoácidos.

(6) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha GPV modificada o GPV truncada consiste en un fragmento del dominio extracelular de una GPV nativa, dicho fragmento tiene una longitud de al menos 30 aminoácidos.

(7) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha GPV modificada o GPV truncada consiste en un fragmento del dominio extracelular de una GPV nativa, dicho fragmento tiene una longitud de al menos 100 aminoácidos.

(8) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha GPV modificada o GPV truncada consiste en un fragmento del dominio extracelular de una GPV nativa, dicho fragmento tiene una longitud de al menos 250 aminoácidos.

(9) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha GPV modificada o GPV truncada consiste en un fragmento del dominio extracelular de una GPV nativa, dicho fragmento tiene una longitud de al menos 400 aminoácidos.

(10) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (4) a (9), en el que dicho fragmento tiene actividad antitrombótica.

(11) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (4) a (10), en el que dicho fragmento no afecta sustancialmente el tiempo de sangrado tras la administración.

- (12) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (4) a (11), en el que dicha GPV nativa consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3, y el dominio extracelular consiste sustancialmente en los aminoácidos 1-503 de la SEQ ID NO: 3.
- 5 (13) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (4) a (11), en el que dicha GPV nativa consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 7, y el dominio extracelular consiste sustancialmente en los aminoácidos 1-502 de la SEQ ID NO: 7.
- 10 (14) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicho polipéptido soluble es un polipéptido que no se produce de forma natural.
- (15) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con el punto (14), que comprende además un resto que prolonga la semivida.
- 15 (16) El polipéptido soluble para su uso de acuerdo con el punto (15), en el que dicho resto que prolonga la semivida se conjuga con dicha GPV modificada, ya sea directamente o mediante un conector.
- (17) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con el punto (16), en el que dicho resto que prolonga la semivida se selecciona del grupo que consiste en hidroxietilalmidón (HES), polietilenglicol (PEG), ácidos polisialícos (PSA) y ligandos de unión a albúmina, por ejemplo, cadenas de ácidos grasos.
- 20 (18) El polipéptido soluble para su uso de acuerdo con el punto (15), en el que dicho resto que prolonga la semivida es una secuencia de aminoácidos heteróloga fusionada a dicha GPV modificada, ya sea directamente o mediante un conector.
- 25 (19) El polipéptido soluble para su uso de acuerdo con el punto (18), en el que la secuencia de aminoácidos heteróloga que prolonga la semivida comprende o consiste en un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en albúmina y un fragmento de la misma que tiene una longitud de al menos 100 amino ácidos, regiones constantes de inmunoglobulina y fragmentos de las mismas, por ejemplo, el fragmento Fc, la transferrina y sus fragmentos, el péptido del terminal C de la gonadotropina coriónica humana, cadenas aleatorias solvatadas con gran volumen hidrodinámico (XTEN), repeticiones de homoaminoácidos (HAP), repeticiones de prolina-alanina-serina (PAS), afamina, alfafetoproteína, proteína de unión a vitamina D, polipéptidos capaces de unirse en condiciones fisiológicas a regiones constantes de albúmina o inmunoglobulina, y combinaciones de los mismos.
- 30 (20) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicho polipéptido soluble se puede obtener mediante expresión recombinante en células eucariotas.
- 35 (21) El polipéptido soluble para su uso de acuerdo con el punto (20), en el que dichas células eucariotas son células de mamífero.
- 40 (22) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con el punto (21), en el que dichas células de mamífero son células CHO.
- (23) El polipéptido soluble para su uso de acuerdo con el punto (20), en el que dichas células eucariotas son células de insecto, por ejemplo, células Sf9.
- 45 (24) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (19), en el que dicho polipéptido soluble se puede obtener mediante expresión recombinante en células procariotas, por ejemplo, en células bacterianas
- 50 (25) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicho polipéptido soluble tiene actividad antitrombótica.
- (26) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicho polipéptido soluble no afecta sustancialmente el tiempo de sangrado tras la administración.
- 55 (27) El polipéptido soluble para uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicho tratamiento y/o prevención comprende además administrar a dicho sujeto un fármaco antiplaquetario o anticoagulante.
- 60 (28) Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido soluble como se define en uno cualquiera de los puntos (1) a (26), y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- (29) La composición farmacéutica del punto (28), en la que el polipéptido soluble no consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10.
- 65

(30) Un procedimiento para preparar el polipéptido soluble de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (26), que comprende expresar un ácido nucleico que codifica el polipéptido soluble como se define en uno cualquiera de los puntos (1) a (26) en una célula de mamífero, y recuperar el polipéptido soluble del medio de cultivo.

(31) Un polipéptido de origen no natural como se define en el punto (14), en el que la glicoproteína V modificada (GPV) es una GPV soluble de origen no natural.

(32) La GPV soluble no natural del punto (31), que no consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10.

(33) Un kit farmacéutico que comprende (i) un polipéptido soluble de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (26), y (ii) un fármaco antiplaquetario o anticoagulante distinto de dicho polipéptido soluble.

(34) El kit farmacéutico del punto (33), en el que el polipéptido soluble no consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: La GPV soluble tiene un efecto antitrombótico en un modelo de lesión aórtica. La aorta abdominal fue lesionada mecánicamente por una única compresión firme con pinzas y el flujo sanguíneo se controló con un medidor de flujo Doppler. Se muestra el tiempo hasta la oclusión final. A, B) Tiempos de oclusión después de la inyección de GPV humana soluble (A: shGPV; B: shGPV-proteína de fusión a albúmina (AFP)) o GPV murina soluble (C: smGPV). Cada símbolo representa un ratón individual. En los casos en que los ratones no pudieron formar trombos oclusivos, se utilizó la prueba exacta de Fisher para calcular los valores P. * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001

Figura 2: La GPV humana soluble protege del accidente cerebrovascular isquémico. Los ratones fueron sometidos a 60 minutos de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO). Los volúmenes de infarto cerebral de ratones de tipo silvestre (barra negra) y de tipo silvestre pretratados con shGPV-AFP (barra gris) se midieron por planimetría 24 h después de tMCAO. Los resultados representan la media \pm DE.

Figura 3: La GPV soluble no tiene ningún efecto en los tiempos de sangrado de la cola. Se muestran los tiempos de sangrado de la cola de las líneas de ratón indicadas que reciben vehículo o GPV humana soluble (A: shGPV; B: shGPV-AFP). Cada símbolo representa un animal.

Figura 4: El tratamiento con GPV soluble da como resultado una cobertura superficial reducida y un volumen de trombos en colágeno por debajo del flujo *in vitro*. A) La sangre humana se trató con shGPV-AFP y se perfundió sobre una superficie recubierta de colágeno a una velocidad de cizallamiento de 1000 s^{-1} . B) La sangre de ratones de tipo silvestre se incubó con smGPV y se perfundió sobre una superficie recubierta de colágeno a una velocidad de cizallamiento de 1700 s^{-1} . Los resultados se muestran como media \pm DE.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un polipéptido soluble que comprende una glicoproteína V modificada (GPV) que carece de un dominio transmembrana funcional para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad trombótica en un sujeto, dicho tratamiento o prevención comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de dicho polipéptido soluble, en el que el polipéptido soluble es incapaz de integrarse en una membrana celular a través de dicho dominio transmembrana, en el que el término GPV denota una proteína que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con respecto a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3. Preferiblemente, la GPV modificada es una GPV truncada.

El término "soluble" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que no está unido a una membrana celular. El polipéptido soluble es incapaz de integrarse en una membrana celular a través de un dominio transmembrana. Típicamente, el polipéptido soluble carece de un dominio transmembrana funcional. Preferiblemente, los polipéptidos solubles son solubles en agua o un tampón, tal como PBS.

Glicoproteína V

El término "Glicoproteína V" o "GPV", de acuerdo con la invención, denota una proteína que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con respecto a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3. Preferiblemente, la GPV tiene una identidad de aminoácidos de al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95% con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3. De acuerdo con la presente invención, una secuencia que se está evaluando (la "Secuencia Comparada") tiene un cierto "Identidad Porcentual", o es un cierto "porcentaje idéntica a" una secuencia reivindicada o descrita (la "Secuencia de Referencia") después de la alineación de las dos secuencias. La "Identidad Porcentual" se determina de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Identidad Porcentual} = 100[1-(C/R)]$$

En esta fórmula, C es el número de diferencias entre la Secuencia de Referencia y la Secuencia Comparada sobre la longitud de alineación entre las dos secuencias en la que (i) cada base en la Secuencia de Referencia que no tiene una base alineada correspondiente en la Secuencia Comparada, y (ii) cada espacio en la Secuencia de Referencia, y (iii) cada base alineada en la Secuencia de Referencia que es diferente de una base alineada en la Secuencia Comparada constituye una diferencia. R es el número de bases de la Secuencia de Referencia sobre la longitud de la alineación con la Secuencia Comparada con cualquier espacio creado en la Secuencia de Referencia que también se cuenta como una base.

Si existe una alineación entre la Secuencia Comparada y la Secuencia de Referencia para la cual la Identidad Porcentual (calculada como anteriormente) es aproximadamente igual o mayor que un mínimo especificado, la Secuencia Comparada tiene esa Identidad Porcentual mínima especificada incluso si las alineaciones pueden existir en otra parte de la secuencia que muestre una Identidad Porcentual inferior que la especificada.

En una realización preferida, la longitud de la secuencia alineada para fines de comparación es al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 60% e incluso más preferiblemente al menos 70%, 80% o 90% de la longitud de la Secuencia de Referencia.

La comparación de las secuencias y la determinación de la identidad porcentual (y la similitud porcentual) entre dos secuencias de aminoácidos se puede lograr usando cualquier programa adecuado, por ejemplo, el programa "SECUENCIAS BLAST 2 (blastp)" (Tatusova et al., FEMS Microbiol. Lett. 1999. 174: 247-250) con los siguientes parámetros: Matriz BLOSUM62; Penalizaciones por espacio abierto 11 y extensión de espacio 1; disminución x de espacio 50; esperado 10,0; tamaño de palabra 3; Filtro: ninguno. De acuerdo con la presente invención, la comparación de secuencias cubre al menos 40 aminoácidos, preferiblemente al menos 80 aminoácidos, más preferiblemente al menos 100 aminoácidos, y lo más preferiblemente al menos 120 aminoácidos.

Normalmente, la GPV es GPV plaquetaria, y la GPV modificada es GPV plaquetaria modificada.

La GPV nativa (es decir, no modificada) comprende un dominio transmembrana funcional, es decir, comprende una secuencia de aminoácidos capaz de conferir integración en una membrana celular (por ejemplo, una membrana plasmática) durante la expresión.

La GPV nativa es una GPV natural. Preferiblemente, la GPV nativa es de origen mamífero. En una realización, la GPV es una GPV humana. De acuerdo con esta realización, la GPV nativa comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3. En otra realización, la GPV nativa es una GPV murina. De acuerdo con esta realización, la GPV nativa comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 7. El término GPV nativa como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, homólogos y ortólogos de GPV humana representados por la SEQ ID NO: 2 (con péptido señal) y SEQ ID NO: 3 (sin péptido señal). A menos que se indique lo contrario, el término GPV se refiere al polipéptido maduro que carece del péptido señal.

Más preferiblemente, la GPV nativa comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3.

GPV modificada

La GPV modificada de acuerdo con esta invención difiere de la GPV nativa de la que se deriva (también denominada como la "GPV original" o la "GPV no modificada") al menos en que el dominio transmembrana ya no es funcional, debido a una mutación o cualquier otro medio. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que representa el dominio transmembrana en la GPV modificada puede tener una o más sustituciones, eliminaciones y/o inserciones en relación con la GPV original. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la GPV modificada carece al menos del dominio transmembrana completo de la GPV original. En otra realización, la GPV modificada es una GPV truncada. El dominio transmembrana de la GPV humana se prolonga desde las posiciones de los aminoácidos 504 a 527 de la SEQ ID NO: 3. El dominio transmembrana de GPV murina se prolonga desde las posiciones de los aminoácidos 503 a 526 de la SEQ ID NO: 7.

Los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 aminoácidos del dominio transmembrana de la GPV pueden eliminarse o sustituirse en la GPV modificada. En una realización, los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 aminoácidos del dominio transmembrana de la GPV humana (aminoácidos 504 a 527 de la SEQ ID NO: 3) pueden eliminarse o sustituirse. En otra realización, los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 aminoácidos del dominio transmembrana de GPV murina (aminoácidos 503 a 526 de la SEQ ID NO: 7) pueden eliminarse o sustituirse.

ES 2 805 318 T3

5 La GPV modificada, preferiblemente la GPV truncada, tiene actividad antitrombótica. La actividad antitrombótica se puede determinar como se muestra en el experimento descrito en el Ejemplo 1 (Véase también "Lesión Mecánica de la Aorta Abdominal" en la sección de "Materiales y Procedimientos" de los Ejemplos). Existe actividad antitrombótica si el compuesto probado (por ejemplo, 20 µg) es capaz de retrasar o prevenir la formación de trombos oclusivos arteriales en ratones. Preferiblemente, la formación de trombos oclusivos arterial se retrasa en al menos 1 minuto, más preferiblemente al menos 5 minutos, lo más preferiblemente al menos 10 minutos.

GPV truncada

10 Una GPV truncada consiste en un fragmento de GPV. El truncamiento típicamente está en el extremo terminal C de la GPV. El extremo terminal N puede estar truncado o no puede estar truncado.

15 El fragmento de GPV tiene una longitud de al menos 6 aminoácidos. Preferiblemente, la longitud del fragmento de GPV es al menos de 7, al menos de 8, al menos de 9, al menos de 10, al menos de 15, al menos de 20, al menos de 50, al menos de 100, al menos de 200, al menos de 300, o al menos de 400 aminoácidos. En ciertas realizaciones, la GPV truncada consiste en un fragmento de la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3, en la que dicho fragmento tiene una longitud mínima de 6 aminoácidos, preferiblemente de al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300 o al menos 400 aminoácidos.

20 En una realización, la GPV truncada tiene un truncamiento en el terminal C y carece del dominio transmembrana completo de la GPV del que se deriva. En otra realización, la GPV truncada tiene un truncamiento en el terminal C y carece del dominio transmembrana de tal manera que la GPV truncada no está unida a la membrana.

25 Las GPV truncadas preferidas consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada de las siguientes secuencias de aminoácidos, en las que todas las posiciones de aminoácidos se refieren a la SEQ ID NO: 3 (realizaciones 1-71) o la SEQ ID NO: 7 (realizaciones 72-141), respectivamente, como se indica:

Tabla 1.

Realización No.	desde	hasta		Realización No.	desde	hasta
	de la SEQ ID NO: 3				de la SEQ ID NO: 3	
1	1	520		72	1	520
2	2	519		73	2	519
3	3	518		74	3	518
4	4	517		75	4	517
5	5	516		76	5	516
6	6	515		77	6	515
7	7	514		78	7	514
8	8	513		79	8	513
9	9	512		80	9	512
10	10	511		81	10	511
11	11	510		82	11	510
12	12	509		83	12	509
13	13	508		84	13	508
14	14	507		85	14	507
15	15	506		86	15	506
16	16	505		87	16	505
17	17	504		88	17	504
18	18	503		89	18	503
19	19	502		90	19	502
20	20	501		91	20	501
21	21	500		92	21	500
22	22	499		93	22	499
23	23	498		94	23	498
24	24	497		95	24	497
25	25	496		96	25	496
26	26	495		97	26	495
27	27	494		98	27	494
28	28	493		99	28	493
29	29	492		100	29	492

ES 2 805 318 T3

30	30	491		101	30	491
----	----	-----	--	-----	----	-----

(continuación)

Realización No.	desde	hasta		Realización No.	desde	hasta
	de la SEQ ID NO: 3				de la SEQ ID NO: 3	
30	30		491		101	
31	31	490		102	31	490
32	32	489		103	32	489
33	33	488		104	33	488
34	34	487		105	34	487
35	35	486		106	35	486
36	36	485		107	36	485
37	37	484		108	37	484
38	38	483		109	38	483
39	39	482		110	39	482
40	40	481		111	40	481
41	41	480		112	41	480
42	42	479		113	42	479
43	43	478		114	43	478
44	44	477		115	44	477
45	45	476		116	45	476
46	46	475		117	46	475
47	47	474		118	47	474
48	48	473		119	48	473
49	49	472		120	49	472
50	50	471		121	50	471
51	51	470		122	51	470
52	52	469		123	52	469
53	53	468		124	53	468
54	54	467		125	54	467
55	55	466		126	55	466
56	56	465		127	56	465
57	57	464		128	57	464
58	58	463		129	58	463
59	59	462		130	59	462
60	60	461		131	60	461
61	61	460		132	61	460
62	62	459		133	62	459
63	63	458		134	63	458
64	64	457		135	64	457
65	65	456		136	65	456
66	66	455		137	66	455
67	67	454		138	67	454
68	68	453		139	68	453
69	69	452		140	69	452
70	70	451		141	70	451
71	71	450		142	71	450

Los límites superior e inferior de las secuencias de aminoácidos de las realizaciones anteriores se pueden combinar entre sí.

5 En particular, las realizaciones preferidas de la GPV truncada consisten en los aminoácidos 1-516 de la SEQ ID NO: 3 o en los aminoácidos 1-502 de la SEQ ID NO: 7.

10 En otras realizaciones, la GPV truncado comprende o consiste en las siguientes secuencias.

Tabla 2.

Realización No.	La GPV truncada comprende o consiste en los siguiente aminoácidos de la SEQ ID NO: 3
143	1-15
144	16-30
145	31-45
146	46-60
147	61-75
148	76-90
149	91-105
150	106-120
151	121-135
152	136-150
153	151-165
154	166-180
155	181-195
156	196-205
157	211-225
158	226-240
159	241-255
160	256-270
161	271-285
162	286-300
163	301-315
164	316-330
165	331-345
166	346-360
167	361-365
168	376-390
169	391-405
170	406-420
171	421-435
172	436-450
173	451-465
174	466-480
175	481-500

En una realización específica de la presente invención, el polipéptido soluble para uso como se describe en el presente documento comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10.

5 En otra realización específica, el polipéptido soluble de la invención es un polipéptido de origen no natural. En otra realización específica más, el polipéptido soluble de la invención no consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10. En otra realización específica más, el polipéptido soluble de la invención es un polipéptido de origen no natural y no consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10.

10 Componentes adicionales del polipéptido

El polipéptido soluble de la invención puede comprender aminoácidos adicionales distintos de los derivados de GPV u otros restos que prolongan la semivida.

15 En una realización de la invención, la semivida del polipéptido soluble de la invención se prolonga por modificación química, por ejemplo, unión, ya sea directamente o por medio de un conector, de un resto que prolonga la semivida tal como polietilenglicol (PEGilación), PEG glicosilado, hidroxietil almidón (HESilación), ácidos polisialícos, polipéptidos similares a elastina, polímeros de heparosano o ácido hialurónico. En otra realización, el polipéptido soluble, preferiblemente la GPV modificada, se conjuga con una proteína que prolonga la semivida (HLEP) tal como la albúmina a través de un conector químico. El principio de esta tecnología de conjugación ha sido descrito a manera de ejemplo por Conjuchem LLC (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 7.256.253).

25 En otra realización de la invención, el polipéptido soluble comprende una secuencia de aminoácidos heteróloga, es decir, heteróloga a la GPV respectiva utilizada, que se fusiona a dicha GPV directamente o mediante un conector.

Las secuencias heterólogas pueden ser secuencias de etiquetas que son reconocidas por anticuerpos u otras moléculas que tienen una alta afinidad por la etiqueta. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, etiquetas de polihistidina, etiqueta FLAG, etiqueta myc, etiqueta GST, etc. Las secuencias de etiqueta generalmente facilitan la purificación del polipéptido tras la expresión en células huésped.

En una realización preferida, el polipéptido soluble comprende además una proteína que prolonga la semivida (HLEP). Preferiblemente, la HLEP es una albúmina o un fragmento de la misma. El terminal N de la albúmina puede fusionarse con el terminal C de la GPV modificada. Una o más HLEP pueden fusionarse a la parte del terminal N o C de la GPV modificada, siempre que no interfieran o eliminen la actividad antitrombótica de la GPV modificada.

En una realización, el polipéptido tiene la siguiente estructura:

mGPV - L1 - H, [fórmula 1]

en la que mGPV es la GPV modificada, L1 es un enlace químico o una secuencia conectora, y H es una HLEP.

L1 puede ser un enlace químico o una secuencia conectora que consiste en uno o más aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 50, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5 o 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2 o 3) aminoácidos y que pueden ser iguales o diferentes entre sí. Por lo general, las secuencias conectoras no están presentes en la posición correspondiente en la GPV de tipo silvestre. Los ejemplos de aminoácidos adecuados presentes en L1 incluyen Gly y Ser. El conector debe ser no inmunogénico y puede ser un conector no escindible o escindible. Los conectores no escindibles pueden estar constituidos por residuos alternos de glicina y serina como se ejemplifica en el documento WO2007/090584. En otra realización de la invención, el conector peptídico entre el resto de GPV modificado y el resto de albúmina consiste en secuencias peptídicas, que sirven como conectores de interdominios naturales en proteínas humanas. Preferiblemente, tales secuencias de péptidos en su entorno natural están ubicadas cerca de la superficie de la proteína y son accesibles para el sistema inmune, de modo que se puede asumir una tolerancia natural contra esta secuencia. Se dan ejemplos en el documento WO2007/090584. Se describen secuencias conectoras escindibles, por ejemplo, en el documento WO 2013/120939 A1.

Las secuencias de HLEP preferidas se describen a continuación. Del mismo modo, la invención abarca fusiones al "aminoácido del terminal N" exacto de la HLEP respectiva, o fusiones a la "parte del terminal N" de la HLEP respectiva, que incluye eliminaciones del terminal N de uno o más aminoácidos de la HLEP. El polipéptido puede comprender más de una secuencia de HLEP, por ejemplo, dos o tres secuencias de HLEP. Estas múltiples secuencias de HLEP pueden fusionarse a la parte del terminal C de GPV modificada en tándem, por ejemplo, como repeticiones sucesivas.

Polipéptidos que prolongan la semivida (HLEP)

Preferiblemente, el resto que prolonga la semivida es un polipéptido que prolonga la semivida (HLEP), más preferiblemente HLEP se selecciona de albúmina o fragmentos de la misma, región constante de inmunoglobulina y fragmentos de la misma, por ejemplo, el fragmento Fc, cadenas aleatorias solvatadas con gran volumen hidrodinámico (por ejemplo, XTEN (Schellenberger et al. Nature Biotechnol. 2009. 27: 1186-1190), repeticiones de homo aminoácidos (HAP) o repeticiones de prolina-alanina-serina (PAS)), afamina, alfa-fetoproteína, proteína de unión a la vitamina D, transferrina o variantes de la misma, péptido del terminal carboxilo (CTP) de la subunidad de gonadotropina β coriónica humana, polipéptidos o lípidos capaces de unirse en condiciones fisiológicas a la región constante de albúmina o inmunoglobulina.

Un "polipéptido que prolonga la semivida" como se usa en el presente documento se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en albúmina, un miembro de la familia de la albúmina, la región constante de inmunoglobulina G y fragmentos de la misma, región y polipéptidos capaces de unirse bajo condiciones fisiológicas, a la albúmina, a miembros de la familia de la albúmina, así como a fragmentos de una región constante de inmunoglobulina. Puede ser una proteína que prolonga la semivida de longitud completa descrita en el presente documento (por ejemplo, albúmina, un miembro de la familia de la albúmina o la región constante de inmunoglobulina G) o uno o más fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica o la actividad biológica de la GPV modificada. Dichos fragmentos pueden tener 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de HLEP o puede incluir parte o la totalidad de los dominios específicos de la HLEP respectiva, siempre que el fragmento de HLEP proporcione una prolongación de semivida funcional de al menos 25% en comparación con el polipéptido respectivo sin la HLEP.

El fragmento de HLEP de los constructos de inserción del factor de coagulación propuesto de la invención puede ser una variante de una HLEP normal. El término "variantes" incluye inserciones, eliminaciones y sustituciones, ya sean conservadoras o no conservadoras, en las que dichos cambios no alteran sustancialmente el sitio activo o el dominio activo que confiere las actividades biológicas de la GPV modificada.

En particular, los constructos de fusión GPV-HLEP modificados propuestos de la invención pueden incluir variantes polimórficas naturales de HLEP y fragmentos de HLEP. La HLEP puede derivarse de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo humano, mono, vaca, oveja o cerdo. Las HLEP no de mamíferos incluyen, entre otros, gallina y salmón.

5

Albúmina como HLEP

Los términos "albúmina de suero humano" (HSA) y "albúmina humana" (HA) y "albúmina" (ALB) se usan indistintamente en esta solicitud. Los términos "albúmina" y "albúmina de suero" son más amplios y abarcan la albúmina de suero humana (y sus fragmentos y variantes), así como la albúmina de otras especies (y sus fragmentos y variantes).

10

Como se usa en el presente documento, "albúmina" se refiere colectivamente a un polipéptido de albúmina o secuencia de aminoácidos, o un fragmento o variante de albúmina, que tiene una o más actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas) de albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a albúmina humana o fragmentos de la misma, especialmente la forma madura de albúmina humana o albúmina de otros vertebrados o fragmentos de la misma, o análogos o variantes de estas moléculas o fragmentos de las mismas.

15

En particular, los constructos de fusión de GPV modificados propuestos de la invención pueden incluir variantes polimórficas de albúmina humana y fragmentos de albúmina humana que se producen naturalmente. En términos generales, un fragmento o variante de albúmina tendrá al menos 10, preferiblemente al menos 40, lo más preferiblemente más de 70 aminoácidos de longitud.

20

El fragmento de albúmina de los constructos de fusión de GPV modificados propuestos de la invención pueden comprender al menos un subdominio o dominio de HA o modificaciones conservadoras del mismo.

25

Inmunoglobulinas como HLEP

En una realización preferida, el polipéptido soluble de la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 9.

30

Inmunoglobulinas como HLEP

Las regiones constantes de inmunoglobulina G (IgG) (Fc) son conocidas en la técnica por aumentar la semivida de las proteínas terapéuticas (Dumont JA, et al., BioDrugs. 2006; 20: 151-160). La región constante de IgG de la cadena pesada consta de 3 dominios (CH1-CH3) y una región bisagra. La secuencia de inmunoglobulina puede derivarse de cualquier mamífero, o de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, respectivamente. IgG y los fragmentos de IgG sin un dominio de unión a antígeno también se pueden usar como HLEP. El fragmento de polipéptido terapéutico está conectado a la IgG o a los fragmentos de IgG preferiblemente a través de la región bisagra del anticuerpo o un conector peptídico, que incluso puede ser escindible. Varias patentes y solicitudes de patentes describen la fusión de proteínas terapéuticas con regiones constantes de inmunoglobulina para mejorar las semividas *in vivo* de las proteínas terapéuticas. Los documentos US 2004/0087778 y WO 2005/001025 describen proteínas de fusión de dominios Fc o al menos fragmentos de regiones constantes de inmunoglobulina con péptidos biológicamente activos que aumentan la semivida del péptido, que de otro modo se eliminarían rápidamente *in vivo*. Se describieron las proteínas de fusión Fc-IFN- β que lograron una mayor actividad biológica, una semivida en circulación prolongada y una mayor solubilidad (documento WO 2006/000448). Se divulgaron proteínas Fc-EPO con una semivida en suero prolongada y una mayor potencia *in vivo* (documento WO 2005/063808), así como fusiones de Fc con G-CSF (documento WO 2003/076567), péptido 1 tipo glucagón (documento WO 2005/000892), factores de coagulación (documento WO 2004/101740) e interleucina 10 (documento US 6.403.077), todos con propiedades de prolongación de la semivida.

35

40

45

50

En ciertas realizaciones, la proteína de fusión Fc es monomérica. En otras realizaciones, la proteína de fusión Fc es dimérica.

55

En el documento WO 2013/120939 se describen en detalle varias HLEP que se pueden usar de acuerdo con esta invención.

Ácido Nucleico y Expresión

El ácido nucleico que codifica el polipéptido a expresar puede prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Sobre la base de la secuencia de ADNc de GPV humana (SEQ ID NO: 1) o de GPV murina (SEQ ID NO: 5), se puede diseñar y generar ADN recombinante que codifica los constructos de GPV modificados mencionadas anteriormente. En la tabla 3 se resumen más detalles de las secuencias humanas y de ratón.

60

65

Tabla 3: Detalles de secuencias de GPV de tipo silvestre de ratón y humano

	Ratón	Humano
Entrez	14729	2814
Ensembl	ENSMUSG00000047953	ENSG00000178732
Uniprot	Q3TA66	P40197
RefSeq de ARNm	NM_008148	NM_004488
RefSeq Proteína	NP_032174	NP_004479
Ubicación	Crom. 16: 30.23 - 30.23 Mb	Crom. 3: 195.6 - 195.6 Mb
Masa molecular [Da]	63251	60828

Los constructos en los que el ADNc contiene el marco de lectura abierto completo insertado en la orientación correcta en un plásmido de expresión se pueden usar para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión típicos contienen promotores que dirigen la síntesis de grandes cantidades de ARNm correspondientes al ácido nucleico insertado en las células portadoras de plásmido. También pueden incluir una secuencia de origen de replicación que permita su replicación autónoma dentro del organismo huésped y secuencias que aumenten la eficiencia con la que se traduce el ARNm sintetizado. Los vectores estables a largo plazo pueden mantenerse como entidades que se replican libremente mediante el uso de elementos reguladores de, por ejemplo, virus (por ejemplo, las secuencias OriP del genoma del virus de Epstein Barr). También se pueden producir líneas celulares que han integrado el vector en el ADN genómico, y de esta manera el producto génico se produce de forma continua.

Normalmente, las células a proporcionar se obtienen mediante la introducción del ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la GPV modificada en células huésped de mamífero.

15 Células huésped

De acuerdo con la presente invención, se puede utilizar cualquier célula huésped susceptible al cultivo celular y a la expresión de polipéptidos, preferiblemente polipéptidos glicosilados. En ciertas realizaciones, la célula huésped es de mamífero. Los ejemplos no limitantes de células de mamífero que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/1, ECACC No: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Países Bajos)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células HEK293 o HEK293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59, 1977); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL10); células de ovario de hámster chino +/- DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216, 1980); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243 251, 1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (HepG2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals NY. Acad. Sci., 383: 44-68, 1982); células MRC 5; células PS4; células de amniocitos humanos (CAP); y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Preferiblemente, la línea celular es una línea celular humana o de roedor, especialmente una línea celular de hámster tal como CHO.

Se conocen en la técnica procedimientos adecuados para introducir ácidos nucleicos suficientes para lograr la expresión de una glicoproteína de interés en células huésped de mamífero. Véase, por ejemplo, Gething, et al., Nature. 1981; 293: 620-625; Mantei, et al., Nature. 1979; 281: 40-46; Levinson et al., EP 117.060; y EP 117.058. Para las células de mamíferos, los procedimientos comunes para introducir material genético en las células de mamíferos incluyen el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Erb (Virology. 1978; 52: 456-457) o el procedimiento lipofectamina^{MR} (Gibco BRL) de Hawley-Nelson (Focus.1993; 15: 73). Axel ha descrito aspectos generales de las transfecciones del sistema de células huésped de mamíferos en el documento US 4.399.216. Para diversas técnicas para introducir material genético en células de mamíferos, véase Keown et al., (Methods in Enzymology, 1989), Keown et al., (Methods in Enzymology. 1990; 185: 527-537), y Mansour et al., (Nature, 1988; 336: 348-352).

El medio basal elegido para cultivar la línea celular huésped no es crítico para la presente invención y puede ser uno cualquiera o una combinación de los conocidos en la técnica que son adecuados para cultivar células de mamífero. Medios tales como el medio Eagle modificado de Dulbecco, el medio F-12 de Ham, el medio esencial mínimo de Eagle y el medio RPMI-1640 y similares están disponibles comercialmente. La adición de factores de crecimiento como la insulina recombinante es opcional. En una realización, el medio de producción está libre de componentes derivados de animales. En una realización preferida, el medio está "libre de proteínas" en el sentido de que está

completamente libre de cualquier proteína o al menos libre de cualquier proteína que no se produzca de forma recombinante. La albúmina de suero humano puede usarse como un suplemento de cultivo sin suero para la producción de la glicoproteína. Opcionalmente, el medio contiene un inhibidor de proteasa, tal como un inhibidor de serina proteasa, que es adecuado para el cultivo de tejidos y que es de origen sintético o vegetal.

5 En general, la presente invención puede usarse con cualquier procedimiento de cultivo celular que sea susceptible a la expresión de glicoproteínas. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en cultivos discontinuos o alimentados por lotes, en los que el cultivo se termina después de una expresión suficiente de la glicoproteína, después de lo cual se cosecha la glicoproteína expresada. Preferiblemente, las células se pueden cultivar en cultivos continuos (por ejemplo, cultivos de perfusión), en los que el medio fresco se agrega periódica o continuamente al cultivo, y la glicoproteína expresada se cosecha periódica o continuamente. El cultivo puede ser de cualquier tipo convencional de cultivo, tal como discontinuo, alimentado por lotes o continuo, pero preferiblemente es continuo. Cultivos continuos adecuados incluyen cultivo de perfusión.

15 Un experto habitual en la técnica podrá adaptar condiciones específicas de cultivo celular para optimizar ciertas características del cultivo celular que incluyen, pero no se limitan a, velocidad de crecimiento, viabilidad celular, densidad celular final del cultivo celular, concentración final de subproductos metabólicos perjudiciales tales como lactato y amonio, título de la glicoproteína expresada, extensión y composición de las cadenas laterales de oligosacáridos o cualquier combinación de estas u otras condiciones consideradas importantes por el profesional.

20 Aislamiento del polipéptido soluble expresado

En general, típicamente será deseable aislar y/o purificar las glicoproteínas expresadas de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, la glicoproteína expresada se secreta en el medio y, por lo tanto, las células y otros sólidos pueden eliminarse, tal como por centrifugación o filtración, por ejemplo, como una primera etapa en el proceso de purificación.

La glicoproteína expresada puede aislarse y purificarse mediante procedimientos estándar que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, exclusión por tamaño y cromatografía de hidroxipatita), filtración en gel, centrifugación o solubilidad diferencial, precipitación con etanol y/o por cualquier otra técnica disponible para la purificación de proteínas (véase, por ejemplo, Scopes, Protein Purification Principles and Practice 2a Edición, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins SJ y Hames BD (eds.), Protein Expression: A Practical Approach, Oxford Univ. Press, 1999; y Deutscher MP, Simon MI, Abelson JN (eds.), Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, Vol. 182), Academic Press, 1997, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia). Para la cromatografía de inmunoafinidad en particular, la glicoproteína puede aislarse uniéndola a una columna de afinidad que comprende anticuerpos que se generaron contra esa glicoproteína y se fijaron a un soporte estacionario. Alternativamente, las etiquetas de afinidad tales como una secuencia de capa de influenza, polihistidina o glutatión-S-transferasa se pueden unir a la glicoproteína mediante técnicas recombinantes estándar para permitir una fácil purificación pasando por la columna de afinidad apropiada. Si la GPV soluble a purificar comprende una HLEP, los anticuerpos dirigidos contra la HLEP u otros compuestos capaces de unirse a la HLEP pueden fijarse a una columna de afinidad para realizar una cromatografía de afinidad. Los inhibidores de la proteasa como el fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), leupeptina, pepstatina o aprotinina pueden agregarse en una cualquiera o en todas las etapas para reducir o eliminar la degradación de la glicoproteína durante el proceso de purificación. Los inhibidores de la proteasa son particularmente ventajosos cuando las células deben lisarse para aislar y purificar la glicoproteína expresada. Adicional o alternativamente, se pueden agregar inhibidores de la glicosidasa en cualquiera o en todas las etapas para reducir o eliminar el recorte enzimático de las cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente.

Un experto habitual en la materia apreciará que la técnica de purificación exacta variará dependiendo del carácter del polipéptido a purificar, el carácter de las células a partir de las cuales se expresa el polipéptido y/o la composición del medio en el que se cultivaron las células.

Composiciones y kits

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el polipéptido soluble de la invención, y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender un polipéptido soluble en una cantidad eficaz para tratar o prevenir una enfermedad trombótica en un sujeto. La composición farmacéutica puede comprender aproximadamente 10 µg - 1.000 mg, preferiblemente aproximadamente 100 µg - 500 mg, más preferiblemente 1 mg - 100 mg del polipéptido soluble. La composición farmacéutica puede comprender aproximadamente 0,01 - 20.000 µg/ml, preferiblemente aproximadamente 0,1 - 1.000 µg/ml, más preferiblemente 0,5 - 500 µg/ml, lo más preferiblemente aproximadamente 100 µg/ml del polipéptido soluble. La composición farmacéutica puede comprender además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los portadores y diluyentes adecuados en la composición farmacéutica son bien conocidos en la técnica.

65

Las formulaciones terapéuticas de las glicoproteínas de la invención adecuadas en los procedimientos descritos en el presente documento pueden prepararse para almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mezclando la glicoproteína 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 como "portadores"), es decir, agentes tamponantes, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicadores, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros aditivos misceláneos, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición (Osol, ed.) 1980. Dichos aditivos deben ser no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas. Los agentes tamponantes ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Pueden presentarse en 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, ácido succínico 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 - 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.

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, metil parabeno, propil parabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio y alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol. Se pueden agregar isotonicadores a veces conocidos como "estabilizadores" para asegurar la isotonicidad de las composiciones líquidas e incluyen alcoholes de azúcar polihídricos, preferiblemente alcoholes de azúcar trihídricos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitól, 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 tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol y similares, incluidos los ciclitoles tales 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 tío sulfato de sodio; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, péptidos de 10 residuos o menos); proteínas tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, 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 tales como el dextrano. Los estabilizadores pueden estar presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 pesos por parte de proteína activa en peso.

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 superficies de cizallamiento estresadas sin causar desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles plurónicos, monoéteres de polioxietilensorbitán (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, o en un intervalo 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 composición farmacéutica puede tener un pH de aproximadamente 5,0-10,0, preferiblemente aproximadamente 5,6-9,0, más preferiblemente aproximadamente 6,0-8,8, lo más preferiblemente aproximadamente 6,5-8,0. Por ejemplo, el pH puede ser de aproximadamente 6,2, 6,5, 6,75, 7,0 o 7,5.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para administración oral, sublingual, intranasal, intraocular, rectal, transdérmica, mucosal, tópica o parenteral. La administración parenteral puede incluir inyección o infusión intradérmica, subcutánea, intramuscular (im), intravenosa (iv), intraperitoneal (ip), intraarterial, intramedular, intracardiaca, intraarticular (articulación), intrasinovial, intracraneal, intraespinal e intratecal (fluidos

espinales), preferiblemente inyección intraperitoneal (ip) en ratón e intravenosa (iv) o subcutánea (sc) en humano. Se puede usar cualquier dispositivo adecuado para inyección o infusión parenteral de formulaciones de fármacos para dicha administración. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede estar contenida en una jeringa precargada estéril.

Otro aspecto de la presente invención es un kit farmacéutico que comprende (i) un polipéptido soluble como se definió anteriormente y (ii) un fármaco anticoagulante o antiplaquetario distinto de dicho polipéptido soluble. En una realización, el polipéptido soluble y el fármaco anticoagulante o antiplaquetario están contenidos en composiciones separadas.

El término "fármaco anticoagulante o antiplaquetario" se refiere a heparinas, inhibidores directos de la trombina (DTI), inhibidores directos o selectivos del Factor Xa (xaban) y antagonistas de la vitamina K (VKA). Por lo tanto, los "fármacos anticoagulantes o antiplaquetarios" pueden incluir heparinas naturales o sintéticas. El término "fármaco anticoagulante o antiplaquetario" también significa que incluye sustancias que evitan la coagulación de la sangre mediante la inhibición directa o selectiva de la trombina o el Factor Xa. En otra realización, la sustancia anticoagulante es un antagonista de la vitamina K.

En algunas realizaciones, el fármaco anticoagulante o antiplaquetario se selecciona de

- (i) una heparina, en particular una heparina no fraccionada (UFH) o una heparina de bajo peso molecular (LMWH),
- (ii) un inhibidor directo de la trombina (DTI), en particular dabigatrán, melagatran, argatroban, hirudina, lepirudina, bivalirudina, ximelagatran o desirrudina (Di Nisio et al. N Engl J Med. 2005; 353: 1028-40),
- (iii) un inhibidor directo o selectivo del Factor Xa (xaban), en particular rivaroxaban (Eriksson et al., Circulation. 114: 2374-81), apixaban (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27: 1238-47), betrixaban, edoxabán, otamixaban (Cohen et al., Circulation 115: 2642-51) o fondaparinux (Peters et al., Eur. Heart J. 29: 324-31) y,
- (iv) un antagonista de la vitamina K (VKA), en particular fenprocumón, acenocumarol o warfarina y moléculas relacionadas que contienen 4-hidroxicumarina, cumatetrililo, dicumarol, biscumacetato de etilo, clorindiona, difenandiona, fenandiona o tiocloamarol (véase, por ejemplo, Ansell et al., 2008, "Pharmacology and management of the vitamin K antagonists", American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines el American College of Chest Physicians (8ª edición). Chest 133 (Suplemento): 160S-198S).

Otro aspecto de la presente invención es un kit farmacéutico que comprende (i) un polipéptido soluble como se definió anteriormente y (ii) un fármaco antiplaquetario o anticoagulante distinto de dicho polipéptido soluble, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un enfermedad trombótica

Tratamiento de enfermedad trombótica

El polipéptido soluble de la invención puede usarse para tratar o prevenir enfermedades trombóticas.

Un "trastorno trombótico" o "enfermedad trombótica" usado en el presente documento es cualquier trastorno o enfermedad caracterizada por la formación de un trombo (coágulo sanguíneo) que obstruye o disminuye el flujo sanguíneo. El trombo puede permanecer local en el lugar donde se formó, o puede desprenderse para ocluir el flujo sanguíneo más adelante (tromboembolismo). En algunas realizaciones, puede ocurrir una trombosis en una vena (trombosis venosa) o en una arteria (trombosis arterial) en cualquier parte del cuerpo, incluidos el corazón y el cerebro. Cuando la trombosis ocurre en la circulación coronaria, se conoce como trombosis coronaria. Cuando la trombosis ocurre en la circulación cerebral, se conoce como trombosis cerebral.

Un trastorno trombótico puede incluir una trombosis venosa, arterial o capilar, formación de trombos en el corazón, tromboembolismo crónico y/o agudo (por ejemplo, embolia pulmonar, tromboembolismo cerebral después de la formación de trombo inducido por fibrilación auricular (por ejemplo, prevención de accidente cerebrovascular en fibrilación auricular (SPAF)), formación de trombos como resultado del contacto de la sangre de un sujeto humano o animal con una superficie artificial (por ejemplo, en pacientes con reemplazos valvulares, en particular una válvula cardíaca mecánica, cánulas intraluminales, intervención coronaria percutánea (PCI), oxigenación de la membrana extracorpórea (ECMO) o padecer una cirugía de derivación cardiopulmonar (cirugía CPB). El trombo puede causar o aumentar el riesgo de accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico agudo, infarto de miocardio, angina inestable, trombosis venosa profunda (DVT), trombosis de la vena porta, tromboembolismo, trombosis de la vena renal, trombosis de la vena yugular, trombosis del seno venoso cerebral, síndrome de Budd-Chiari, enfermedades de Paget-Schroetter o isquemia cerebral silenciosa (SBI). Una enfermedad trombótica de acuerdo con esta invención puede incluir además embolia pulmonar, aterosclerosis, factor V de Leiden, deficiencia de antitrombina III, deficiencia de proteína C, deficiencia de proteína S, mutación del gen de protrombina (G20210A), hiperhomocisteinemia, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, anticuerpo anticardiolipina, síndrome de trombosis, síndrome de lupus anticoagulante, neoplasia maligna, cirugía mayor, inmovilización, uso de anticonceptivos orales, uso de talidomida, especialmente en combinación con dexametasona, trombocitopenia inducida por heparina, embarazo, trastornos mieloproliferativos, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome nefrótico, hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome de hiperviscosidad, macroglobulinemia de Waldenstrom, y trauma. El término

enfermedad trombótica también se refiere a trombosis inducida por el cáncer, por ejemplo, mieloma múltiple y otros cánceres hematológicos, adenocarcinoma, cáncer de páncreas, estómago, ovarios, próstata, colon, pulmón, cerebro, mama, riñón, piel, cuello uterino y cáncer de oído-nariz-garganta.

5 El término "enfermedad trombótica" incluye particularmente afecciones tromboinflamatorias. Trombo-inflamación significa estados de enfermedad, en los que las cascadas protrombóticas y proinflamatorias actúan en conjunto y están mecánicamente vinculadas para promover la progresión de la enfermedad y el daño a los órganos. Los estados de enfermedad trombo-inflamatoria incluyen afecciones de daño orgánico postisquémico, tal como lesión por isquemia/reperfusión (lesión I/R) del cerebro (en accidente cerebrovascular isquémico agudo), pulmón, hígado, colon, miocardio o músculo esquelético, pero también afecciones inflamatorias sistémicas tales como sepsis o choque séptico.

15 Preferiblemente, la enfermedad trombótica se selecciona del grupo que consiste en afecciones tromboinflamatorias, trombosis venosa, trombosis arterial, trombosis capilar, trombosis de vena porta, trombosis de vena renal, trombosis de vena yugular, trombosis de seno venoso cerebral, formación de trombo durante o después de contactar sangre con una superficie artificial, en particular oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO), aterosclerosis, artritis, coagulopatía, trombosis venosa profunda (DVT), coagulopatía intravascular diseminada (DIC), tromboembolismo crónico o agudo, tromboembolismo pulmonar, síndrome de Budd-Chiari, Enfermedades de Paget-Schroetter, accidente cerebrovascular e infarto de miocardio.

20 La determinación de la dosificación efectiva, el número total de dosis y la duración del tratamiento con un polipéptido soluble 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. La dosificación de un polipéptido soluble de la invención a administrar variará de acuerdo con el polipéptido soluble particular, el sujeto y la naturaleza y gravedad de la enfermedad, la condición física del sujeto, el régimen terapéutico (por ejemplo, si un segundo agente terapéutico se usa), y la ruta de administración seleccionada; la dosis apropiada puede ser determinada fácilmente por un experto en la materia.

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

35 Un experto en la materia reconocerá que la cantidad óptima y el espaciamiento de las dosificaciones individuales de un polipéptido soluble de la invención estarán determinadas por la naturaleza y el grado de la afección a tratar, la forma, la ruta y el sitio 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 utilizarán. 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.

Tabla 4: Resumen de las secuencias que se muestran en el listado de secuencias

SEQ ID NO:	Descripción
1	ADNc que codifica GPV humana
2	Secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 1; los aminoácidos 1-16 representan el péptido señal
3	Secuencia de aminoácidos de GPV humana sin péptido señal
4	Secuencia de aminoácidos de GPV humana soluble con etiqueta poli-His (sin péptido señal)
5	ADNc que codifica GPV murina
6	Secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 5; los aminoácidos 1-16 representan el péptido señal
7	Secuencia de aminoácidos de GPV murina sin péptido señal
8	Secuencia de aminoácidos de GPV murina soluble con etiqueta flag (sin péptido señal)
9	Secuencia de aminoácidos de GPV humana soluble fusionada a albúmina a través de un conector (sin péptido señal)
10	Secuencia de aminoácidos del producto de escisión de trombina natural de GPV humana

Ejemplos

45

Resultados

Ejemplo 1: La GPV soluble tiene un efecto antitrombótico

Con el fin de investigar un posible efecto de sGPV sobre la formación de trombos *in vivo* en un modelo de lesión mecánica de la aorta abdominal, se inyectaron 20 µg de sGPV humana (shGPV) por vía intravenosa en ratones de tipo silvestre directamente antes del experimento. Dentro de los 8 minutos posteriores a la lesión aórtica, el flujo sanguíneo se detuvo debido a la formación de trombos oclusivos en ratones de control inyectados con PBS (Figura 1). El tratamiento previo con ratones de tipo silvestre protegidos con sGPV contra la formación de trombos oclusivos arteriales indica que el shGPV tiene un efecto antitrombótico (Figura 1).

Ejemplo 2: La GPV humana soluble protege del accidente cerebrovascular isquémico

Para evaluar el papel de la GPV soluble en el infarto cerebral después de la isquemia cerebral focal, los ratones fueron sometidos a una oclusión transitoria de la arteria cerebral media de 60 minutos (tMCAO), y el volumen del infarto se evaluó después de 24 horas. Sorprendentemente, los volúmenes de infarto en ratones de tipo silvestre tratados con shGPV-AFP se redujeron significativamente en comparación con los ratones de tipo silvestre (Figura 2). Por lo tanto, el tratamiento previo con GPV humana soluble proporciona protección contra la progresión del infarto cerebral.

Ejemplo 3: La GPV humana soluble no tiene efecto sobre los tiempos de sangrado de la cola

Para evaluar el papel de la GPV soluble en la hemostasia, los ratones tratados con vehículo o 20 µg de GPV humana soluble (shGPV) se sometieron al ensayo del tiempo de sangrado de la cola. Se extrajo un segmento de 2 mm de la punta de la cola con un bisturí. El sangrado de la cola se controló absorbiendo suavemente sangre con papel de filtro a intervalos de 20 segundos sin contactar directamente el sitio de la herida. Cuando no se observó sangre en el papel, se determinó que el sangrado había cesado (Figura 3). Estos datos demuestran que las dosis de shGPV que ejercen efectos antitrombóticos (Figura 1) no afectan la hemostasia, lo que indica que shGPV es un agente antitrombótico seguro.

Ejemplo 4: Adhesión a colágeno bajo flujo *in vitro*

Para evaluar el papel de la GPV soluble en la formación de trombos en el colágeno bajo flujo en un ensayo *in vitro*, se incubó sangre completa anticoagulada con 20 µg de GPV soluble durante 5 minutos y se perfundió sobre una superficie recubierta de colágeno. La sangre humana tratada previamente con shGPV-AFP (A) o la sangre de tipo silvestre tratada previamente con GPV murina soluble (B) exhibió una cobertura superficial significativamente reducida y una formación de trombo reducida. Por lo tanto, el ensayo de adhesión de flujo *in vitro* modela las condiciones *in vivo* en gran medida y reproduce el fenotipo *in vivo*.

Materiales y Procedimientos para los Ejemplos 1-4

Ratones

Los estudios en animales fueron aprobados por el gobierno del distrito de la Baja Franconia (Bezirksregierung Unterfranken).

GPV soluble

1. GPV humana soluble (shGPV)

La GPV humana soluble (aa 1-518 de GPV humana madura) se expresó de forma recombinante en células de insecto transfectadas con baculovirus, se purificó usando una columna de ácido nitrilotriacético estándar (Ni-NTA) y se resolvió en tampón PBS. La pureza se verificó utilizando SDS PAGE estándar.

Secuencia de aminoácidos de shGPV madura (péptido señal no mostrado):

QPFPCPPACKCVFRDAAQCSGGDVARI SALGLPTNLTHILLFGMGRGVLQSQSFSGMTVLQRLMISDSHISAVAP
 GTFSDLIKLTLRLSRNI THLPGALLDKMVLLEQLFLDHNALRGIDQNMVQKLVNLQELALNQNQLDFLPASLF
 TNLENLKLDDLSGNNLTHLPKGLLGAQAKLERLLLHSNRLVSLDSGLLNSLGALTELQFHRNHIRSIAPGAFDRL
 PNLSSLTLSRNHLAFLPSALFLHSHNLTLTLFENPLAELPGVLFVGFEMGGLQELWLNRTQLRTLPAAFRNLSRL
 RYLGVTLSPRLSALPQGAFFQGLGELQVLALHSNGLTALPDGLLRGLGKLRQVSLRRNRLRALPRALFRNLSLES
 VQLDHNQLETLPGDVFALPRLTEVLLGHNSWRDCGLGPFVGLWLRQHLGLVGGEEP PRCAGPGAHAGLPLWALP
 GGDAECPGPRGPPRPAADSSSEAPVHPALAPNSSEPWWAQPVTGKGQDHSFVWGFYFLLLAVQAHHHHHHHHH
 HH (SEQ ID NO:4)

(Cursiva: etiqueta poli-His)

2. GPV humana soluble fusionada a albúmina (shGPV-AFP)

5 La shGPV-AFP se expresó en células CHO K1 y se produjo en un sistema de fermentación de perfusión. La cosecha libre de células se concentró 30 veces usando un sistema TFF (por ejemplo, Centramate 500 S Pall) con una membrana de 30 kD (por ejemplo, Centramate OS030T12). Ese concentrado se enriqueció con NaCl y EDTA hasta una concentración final de 0,75 mol/l de NaCl y 5 mmol/l de EDTA y se cargó durante la noche en una columna CaptureSelect de Albúmina humana (Life Technologies) que se equilibró previamente con tampón Tris 20 mM, pH 7,4. Después de lavar la columna con tampón de equilibrio, se eluyó la shGPV-AFP con Tris 20 mM más tampón de MgCl 2 M pH 7,4. El eluato se concentró y se dializó contra Tris 50 mM + NaCl 150 mM, pH 7,4 usando filtros de ultrafiltración con un corte de 30 kD (por ejemplo, Amicon Ref. UFC903024).

15 Secuencia de aminoácidos de shGPV-AFP madura (péptido señal no mostrado):

QPFPCPPACKCVFRDAAQCSGGDVARI SALGLPTNLTHILLFGMGRGVLQSQSFSGMTVLQRLMISDSHISAVAP
 GTFSDLIKLTLRRLSRNKITHLPGALLDKMVLLLEQLFLDHNALRGIDQNMVFQKLVNLQELALNQNQLDFLPASLF
 TNLENLKLKLLDLSGNNLTHLPKGLLGAQAKLERLLLHNSRNLVSLDSGLLNSLGALTELFHRNHIRSIAPGAFDRL
 PNLSSLTLNRHLAFLPSALFLHSHNLTLLTLFENPLAELPGVLFGEMGGLQELWLNRTQLRTPAAAFRNLSRL
 RYLGVTLSPRLSALPQGAFFQGLGELQVLAHNSGLTALPDGLLRGLGKLRQVSLRRNRLRALPRALFRNLSLES
 VQLDHNQLETLPGDVFGALPRLTEVLLGHNSWRDCGLGPFGLWLRQHLGLVGGEEPCCAGPGAHAGLPLWALP
 GGDAECPGPRAVGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSDAHKSEVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQ
 QCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKD
 DNPNLPRLVPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKL
 DELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDR
 ADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY
 EYARRHPDYSVVLLLRLLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLELFEQLGEYKFNAL
 LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLV
 NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEK
 CCKADDKETCFAEEGKLVAAASQAALGL (SEQ ID NO:9)

(Subrayado: sitio de escisión de trombina y conector de GGS; cursiva: secuencia de albúmina humana)

3. GPV murina soluble (smGPV)

20 La GPV murina soluble (aa 1-519 de GPV murina madura) se expresó recombinantemente en células CHO, se purificó usando una columna anti-Flag y se resolvió en tampón de PBS. La pureza se verificó utilizando SDS PAGE estándar.

25 Secuencia de aminoácidos de smGPV madura (péptido señal no mostrado):

QPFPCPKTCKCVVRDAAQCSGGSVAHIAELGLPTNLTHILLFRMDQGI LRNHSFSGMTVLQRQMLSDSHISAIIDP
 GTFNDLVKLTLRRLTRNKI SRLPRAI LDKMVLLLEQLFLDHNALRDLQNLFFQQLRNLQELGLNQNQLSFLPANLF
 SSLRELKLLDLSRNNLTHLPKGLLGAQVKLEKLLLYSNQLTSVDSGLLNSLGALTELRRLERNHLRSVAPGAFDRL
 GNLSLTLTSGNLLSPPALFLHVSSVSRILTLENPLEELPDVLFGEMAGLRELWLNGLTHLSTLPAAAFRNLSGL
 QTLGLTRNPRLSALPRGVFQGLRELRLVGLHTNALAE LRDDALRGLGHLRQVSLRHNRLRALPRTLFRNLSLES
 VQLEHNQLETLPGDVFAALPQLTQVLLGHNPWLCDCGLWRFLQWLRHHPDILGRDEPPQCRGPEPRASLSFWELL
 30 QGDPWCPDPRSLPLDPPTENALEAPVPSWLPNSWQSQTWAQLVARGESPNNRLECGRNPAFLYKVVLEM DYKDDD
 DK (SEQ ID NO:8)

(Cursiva: etiqueta Flag)

Lesión mecánica de la aorta abdominal

5 Para abrir la cavidad abdominal de ratones anestesiados (10-16 semanas de edad), se realizó una incisión longitudinal en la línea media y se expuso la aorta abdominal. Se colocó una sonda de flujo ultrasónico Doppler (Transonic Systems, Maastricht, Países Bajos) alrededor de la aorta y se indujo la trombosis mediante una lesión mecánica con una única compresión firme (15 s) de un fórceps más delante de la sonda de flujo. Se controló el flujo sanguíneo hasta que se produjo la oclusión completa o transcurrieron 30 minutos.

10

Oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO)

15 La isquemia cerebral focal se indujo en ratones de 8 a 12 semanas de edad por una oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO). La anestesia por inhalación fue inducida mediante isoflurano al 2% en una mezcla de 70% de N₂/30% de O₂ y se utilizó un dispositivo de calentamiento servocontrolado para registrar y mantener la temperatura corporal durante el procedimiento quirúrgico. La duración del procedimiento quirúrgico por animal se mantuvo por debajo de 15 minutos. Se hizo avanzar un monofilamento de nailon 6.0 recubierto con goma de silicona (6021PK10, Docol, Redlands, CA, EE. UU.) a través de la arteria carótida hasta el origen de la arteria cerebral media (MCA) que causa un infarto de la MCA. Después de un tiempo de oclusión de 60 minutos, se retiró el filamento permitiendo la reperfusión. Los animales se sacrificaron 24 h después de la reperfusión y se verificaron los cerebros en busca de hemorragias intracerebrales. El grado del infarto se evaluó cuantitativamente 24 horas después de la reperfusión en secciones de cerebro teñidas con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC, Sigma-Aldrich) (solución al 2% (p/v)). Las mediciones planimétricas de las áreas infartadas (software ImageJ, NIH, Bethesda, MD, EE. UU.) corregidas por el edema cerebral se realizaron de forma ciega.

25

Ensayo de tiempo de sangrado

30 Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de anestesia triple y se extrajo un segmento de 2 mm de la punta de la cola con un bisturí. El sangrado de la cola se controló absorbiendo suavemente sangre con papel de filtro a intervalos de 20 s sin contactar directamente el sitio de la herida. Cuando no se observó sangre en el papel, se determinó que el sangrado había cesado. El experimento se detuvo manualmente después de 20 minutos por cauterización.

35

Formación de trombos en colágeno bajo flujo *in vitro*

40 Para la adhesión al colágeno, los cubreobjetos se recubrieron con 200 µg ml⁻¹ de colágeno I a 37 °C y/o y se bloquearon durante 1 h con BSA al 1% en PBS. La sangre entera (700 µl + 300 µl de heparina (20 U/ml en TBS, pH 7,3)) se diluyó 2:1 en el tampón de Tyrode que contenía Ca²⁺ y se introdujo en una jeringa de 1 ml. Antes de la perfusión, la sangre anticoagulada se incubó con derivado anti-GPIX conjugado con Dylight-488 (0,2 µg/ml) a 37 °C durante 5 minutos. Las cámaras de flujo transparentes con una profundidad de corte de 50 µm, equipadas con cubreobjetos recubiertos, se conectaron a una jeringa que se llenó con sangre entera diluida. La perfusión se realizó usando una bomba sin pulsos bajo alto estrés por cizallamiento equivalente a una velocidad de cizallamiento de la pared de 1.000 s⁻¹ o 1.700 s⁻¹. La formación de agregados se visualizó con un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200 (objetivo 40x/0,60). Las imágenes de contraste de fase y fluorescencia se grabaron con una cámara CoolSNAP-EZ y se analizaron fuera de línea utilizando el software MetaVue.

45

Análisis estadístico

50 Los resultados se muestran como media ± DE de al menos tres experimentos individuales por grupo. Cuando fue aplicable, se utilizó la prueba exacta de Fisher para el análisis estadístico. De lo contrario, la prueba t de Welch se realizó para el análisis estadístico. Los valores p <0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Listado de secuencias

55

<110> Julius-Maximilians-Universität Würzburg

<120> Glicoproteína V soluble como agente antitrombótico

<130> 2015_M002_A251

60

<150> EP15202530.0

<151> 2015-12-23

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1
 <211> 3493
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (32)..(1714)

15 <400> 1

```

agttactttg gagtgcagaa ccatttcaga c atg ctg agg ggg act cta ctg      52
                               Met Leu Arg Gly Thr Leu Leu
                               1                               5

tgc gcg gtg ctc ggg ctt ctg cgc gcc cag ccc ttc ccc tgt ccg cca      100
Cys Ala Val Leu Gly Leu Leu Arg Ala Gln Pro Phe Pro Cys Pro Pro
                               10                               20

gct tgc aag tgt gtc ttc cgg gac gcc gcg cag tgc tcg ggg ggc gac      148
Ala Cys Lys Cys Val Phe Arg Asp Ala Ala Gln Cys Ser Gly Gly Asp
                               25                               30                               35

gtg gcg cgc atc tcc gcg cta ggc ctg ccc acc aac ctc acg cac atc      196
Val Ala Arg Ile Ser Ala Leu Gly Leu Pro Thr Asn Leu Thr His Ile
40                               45                               50                               55

ctg ctc ttc gga atg ggc cgc ggc gtc ctg cag agc cag agc ttc agc      244
Leu Leu Phe Gly Met Gly Arg Gly Val Leu Gln Ser Gln Ser Phe Ser
                               60                               65                               70

ggc atg acc gtc ctg cag cgc ctc atg atc tcc gac agc cac att tcc      292
Gly Met Thr Val Leu Gln Arg Leu Met Ile Ser Asp Ser His Ile Ser
                               75                               80                               85

gcc gtt gcc ccc ggc acc ttc agt gac ctg ata aaa ctg aaa acc ctg      340
Ala Val Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asp Leu Ile Lys Leu Lys Thr Leu
                               90                               95                               100

agg ctg tcg cgc aac aaa atc acg cat ctt cca ggt gcg ctg ctg gat      388
Arg Leu Ser Arg Asn Lys Ile Thr His Leu Pro Gly Ala Leu Leu Asp
105                               110                               115

aag atg gtg ctc ctg gag cag ttg ttt ttg gac cac aat gcg cta agg      436
Lys Met Val Leu Leu Glu Gln Leu Phe Leu Asp His Asn Ala Leu Arg
120                               125                               130                               135

ggc att gac caa aac atg ttt cag aaa ctg gtt aac ctg cag gag ctc      484
    
```

ES 2 805 318 T3

Gly	Ile	Asp	Gln	Asn	Met	Phe	Gln	Lys	Leu	Val	Asn	Leu	Gln	Glu	Leu		
				140					145					150			
gct	ctg	aac	cag	aat	cag	ctc	gat	ttc	ctt	cct	gcc	agt	ctc	ttc	acg		532
Ala	Leu	Asn	Gln	Asn	Gln	Leu	Asp	Phe	Leu	Pro	Ala	Ser	Leu	Phe	Thr		
			155					160					165				
aat	ctg	gag	aac	ctg	aag	ttg	ttg	gat	tta	tcg	gga	aac	aac	ctg	acc		580
Asn	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Leu	Leu	Asp	Leu	Ser	Gly	Asn	Asn	Leu	Thr		
		170					175					180					
cac	ctg	ccc	aag	ggg	ttg	ctt	gga	gca	cag	gct	aag	ctc	gag	aga	ctt		628
His	Leu	Pro	Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Gln	Ala	Lys	Leu	Glu	Arg	Leu		
	185					190					195						
ctg	ctc	cac	tcg	aac	cgc	ctt	gtg	tct	ctg	gat	tcg	ggg	ctg	ttg	aac		676
Leu	Leu	His	Ser	Asn	Arg	Leu	Val	Ser	Leu	Asp	Ser	Gly	Leu	Leu	Asn		
200					205					210					215		
agc	ctg	ggc	gcc	ctg	acg	gag	ctg	cag	ttc	cac	cga	aat	cac	atc	cgt		724
Ser	Leu	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Leu	Gln	Phe	His	Arg	Asn	His	Ile	Arg		
				220				225						230			
tcc	atc	gca	ccc	ggg	gcc	ttc	gac	cgg	ctc	cca	aac	ctc	agt	tct	ttg		772
Ser	Ile	Ala	Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Arg	Leu	Pro	Asn	Leu	Ser	Ser	Leu		
		235					240						245				
acg	ctt	tcg	aga	aac	cac	ctt	gcg	ttt	ctc	ccc	tct	gcg	ctc	ttt	ctt		820
Thr	Leu	Ser	Arg	Asn	His	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Ser	Ala	Leu	Phe	Leu		
		250					255					260					
cat	tcg	cac	aat	ctg	act	ctg	ttg	act	ctg	ttc	gag	aac	ccg	ctg	gca		868
His	Ser	His	Asn	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Phe	Glu	Asn	Pro	Leu	Ala		
	265				270					275							
gag	ctc	ccg	ggg	gtg	ctc	ttc	ggg	gag	atg	ggg	ggc	ctg	cag	gag	ctg		916
Glu	Leu	Pro	Gly	Val	Leu	Phe	Gly	Glu	Met	Gly	Gly	Leu	Gln	Glu	Leu		
280					285				290						295		
tgg	ctg	aac	cgc	acc	cag	ctg	cgc	acc	ctg	ccc	gcc	gcc	gcc	ttc	cgc		964
Trp	Leu	Asn	Arg	Thr	Gln	Leu	Arg	Thr	Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Phe	Arg		
				300					305					310			
aac	ctg	agc	cgc	ctg	cgg	tac	tta	ggg	gtg	act	ctg	agc	ccg	cgg	ctg		1012
Asn	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Tyr	Leu	Gly	Val	Thr	Leu	Ser	Pro	Arg	Leu		
			315					320					325				
agc	gcg	ctt	ccg	cag	ggc	gcc	ttc	cag	ggc	ctt	ggc	gag	ctc	cag	gtg		1060
Ser	Ala	Leu	Pro	Gln	Gly	Ala	Phe	Gln	Gly	Leu	Gly	Glu	Leu	Gln	Val		
		330					335					340					
ctc	gcc	ctg	cac	tcc	aac	ggc	ctg	acc	gcc	ctc	ccc	gac	ggc	ttg	ctg		1108
Leu	Ala	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Leu	Thr	Ala	Leu	Pro	Asp	Gly	Leu	Leu		
	345					350					355						
cgc	ggc	ctc	ggc	aag	ctg	cgc	cag	gtg	tcc	ctg	cgc	cgc	aac	agg	ctg		1156
Arg	Gly	Leu	Gly	Lys	Leu	Arg	Gln	Val	Ser	Leu	Arg	Arg	Asn	Arg	Leu		
360					365					370					375		
cgc	gcc	ctg	ccc	cgt	gcc	ctc	ttc	cgc	aat	ctc	agc	agc	ctg	gag	agc		1204
Arg	Ala	Leu	Pro	Arg	Ala	Leu	Phe	Arg	Asn	Leu	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser		
				380					385					390			

ES 2 805 318 T3

gtc cag ctc gac cac aac cag ctg gag acc ctg cct ggc gac gtg ttt 1252
Val Gln Leu Asp His Asn Gln Leu Glu Thr Leu Pro Gly Asp Val Phe
395 400 405

ggg gct ctg ccc cgg ctg acg gag gtc ctg ttg ggg cac aac tcc tgg 1300
Gly Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Val Leu Leu Gly His Asn Ser Trp
410 415 420

cgc tgc gac tgt ggc ctg ggg ccc ttc ctg ggg tgg ctg cgg cag cac 1348
Arg Cys Asp Cys Gly Leu Gly Pro Phe Leu Gly Trp Leu Arg Gln His
425 430 435

cta ggc ctc gtg ggc ggg gaa gag ccc cca cgg tgc gca ggc cct ggg 1396
Leu Gly Leu Val Gly Gly Glu Glu Pro Pro Arg Cys Ala Gly Pro Gly
440 445 450 455

gcg cac gcc ggc ctg ccg ctc tgg gcc ctg ccg ggg ggt gac gcg gag 1444
Ala His Ala Gly Leu Pro Leu Trp Ala Leu Pro Gly Gly Asp Ala Glu
460 465 470

tgc ccg ggc ccc cgg ggc ccg cct ccc cgc ccc gct gcg gac agc tcc 1492
Cys Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Pro Arg Pro Ala Ala Asp Ser Ser
475 480 485

tcg gaa gcc cct gtc cac cca gcc ttg gct ccc aac agc tca gaa ccc 1540
Ser Glu Ala Pro Val His Pro Ala Leu Ala Pro Asn Ser Ser Glu Pro
490 495 500

tgg gtg tgg gcc cag ccg gtg acc acg ggc aaa ggt caa gat cat agt 1588
Trp Val Trp Ala Gln Pro Val Thr Thr Gly Lys Gly Gln Asp His Ser
505 510 515

ccg ttc tgg ggg ttt tat ttt ctg ctt tta gct gtt cag gcc atg atc 1636
Pro Phe Trp Gly Phe Tyr Phe Leu Leu Leu Ala Val Gln Ala Met Ile
520 525 530 535

acc gtg atc atc gtg ttt gct atg att aaa att ggc caa ctc ttt cga 1684
Thr Val Ile Ile Val Phe Ala Met Ile Lys Ile Gly Gln Leu Phe Arg
540 545 550

aaa tta atc aga gag aga gcc ctt ggg taa accaatggga aaatcttcta 1734
Lys Leu Ile Arg Glu Arg Ala Leu Gly
555 560

attacttaga acctgaccag atgtggctcg gaggggaatc cagaccgct gctgtcttgc 1794

tctccctccc ctcccactc ctctctctt ctctctctc tctctcactg ccacgccttc 1854

ctttccctcc tctcccccct ctccgctctg tgctcttcat tctcacaggc ccgcaacccc 1914

tcctctctgt gtccccgcc cgttcctgga aactgagctt gacgtttgta aactgtggtt 1974

gcctgccttc cccagctccc acgagggtgt gcgctgacac tgccgggggc gctggactgt 2034

gttggaacca tccgtgctcc gctgtgctg gcttggcgctc tgggagagag aggggcctct 2094

tcagtgtcta ctgagtaagg ggacagctcc aggccggggc ctgtctcctg cacagagtaa 2154

gccggtaaat gtttgtgaaa tcaatgctg gataaaggaa cacatgcat ccaagtgatg 2214

atggcttttc ctggagggaa aggataggct gttgctctat ctaatTTTTT gtttttgttt 2274

ttggacagtc tagctctgtg gcccaggctg gcgtgcagtg ggccgtotca gttcactgca 2334

ES 2 805 318 T3

gcctccgcct cccaggttca agtgattctc atgcctcagc gttctgagta gctgggatta 2394
gaggcgtgtg ccoactacacc cggctaattt ttgtactttt taaagtagag acggggcttt 2454
gccatattgg cctggctgat ctcaaactcc tgggtottgaa ctccctggcca caagtgatct 2514
gcccgccttg gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcgta agccactaca cctggccctc 2574
ttcatcgaat tttatttgag aagtagagct cttgccattt tttcccttgc tccatttttc 2634
tcactttatg tctctctgac ctatgggcta cttgggagag cactggactc cattcatgca 2694
tgagcatttt caggataagc gacttctgtg aggctgagag aggaagaaaa cacggagcct 2754
tccctccagg tgcccagtgt aggtccagcg tgtttcctga gcctcctgtg agtttccact 2814
tgctttacat ccatgcaaca tgtcattttg aaactggatt gatttgcatt tcctggaact 2874
ctgccacctc atttcacaag catttatgga gcagttaaca tgtgactggg attcatgaat 2934
ataatgataa gcttgattct agttcagctg ctgtcacagt ctcatttggt cttccaactg 2994
aaagccgtaa aacctttggt gctttaattg aatgtctgtg cttatgagag gcagtggtta 3054
aaacaggggc tggcgagttg acaactgtgg gttcaaatcc cagctctacc acttactaac 3114
tgcattggac tttgggtaag acacctgctt acattctcta agccttggtt tcctgaacct 3174
taaaacagga taacatagta cctgcttcgt agagtttttg tgagaattaa aggcaataaa 3234
gcatataatg acttagccca gcggcctgca ggcaatacat gttaatgaat gttagctatt 3294
attactaaag gatgagcaat tattattggc atcatgattt ctaaagaaga gctttgagtt 3354
ggatattttc tctgtgtata agggtaagtc cgaactttct cagactggag gttacattca 3414
catcagctcg tcttcccctg cggatggcct cagccctggg tggccagact ctgtgctcac 3474
aatccagagc aatggatcc 3493

5 <210> 2
<211> 560
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 2

Met Leu Arg Gly Thr Leu Leu Cys Ala Val Leu Gly Leu Leu Arg Ala
1 5 10 15
Gln Pro Phe Pro Cys Pro Pro Ala Cys Lys Cys Val Phe Arg Asp Ala
20 25 30
Ala Gln Cys Ser Gly Gly Asp Val Ala Arg Ile Ser Ala Leu Gly Leu
35 40 45
Pro Thr Asn Leu Thr His Ile Leu Leu Phe Gly Met Gly Arg Gly Val
50 55 60

ES 2 805 318 T3

Leu Gln Ser Gln Ser Phe Ser Gly Met Thr Val Leu Gln Arg Leu Met
 65 70 75 80

Ile Ser Asp Ser His Ile Ser Ala Val Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asp
 85 90 95

Leu Ile Lys Leu Lys Thr Leu Arg Leu Ser Arg Asn Lys Ile Thr His
 100 105 110

Leu Pro Gly Ala Leu Leu Asp Lys Met Val Leu Leu Glu Gln Leu Phe
 115 120 125

Leu Asp His Asn Ala Leu Arg Gly Ile Asp Gln Asn Met Phe Gln Lys
 130 135 140

Leu Val Asn Leu Gln Glu Leu Ala Leu Asn Gln Asn Gln Leu Asp Phe
 145 150 155 160

Leu Pro Ala Ser Leu Phe Thr Asn Leu Glu Asn Leu Lys Leu Leu Asp
 165 170 175

Leu Ser Gly Asn Asn Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Leu Leu Gly Ala
 180 185 190

Gln Ala Lys Leu Glu Arg Leu Leu Leu His Ser Asn Arg Leu Val Ser
 195 200 205

Leu Asp Ser Gly Leu Leu Asn Ser Leu Gly Ala Leu Thr Glu Leu Gln
 210 215 220

Phe His Arg Asn His Ile Arg Ser Ile Ala Pro Gly Ala Phe Asp Arg
 225 230 235 240

Leu Pro Asn Leu Ser Ser Leu Thr Leu Ser Arg Asn His Leu Ala Phe
 245 250 255

Leu Pro Ser Ala Leu Phe Leu His Ser His Asn Leu Thr Leu Leu Thr
 260 265 270

Leu Phe Glu Asn Pro Leu Ala Glu Leu Pro Gly Val Leu Phe Gly Glu
 275 280 285

Met Gly Gly Leu Gln Glu Leu Trp Leu Asn Arg Thr Gln Leu Arg Thr
 290 295 300

Leu Pro Ala Ala Ala Phe Arg Asn Leu Ser Arg Leu Arg Tyr Leu Gly

ES 2 805 318 T3

305 310 315 320

Val Thr Leu Ser Pro Arg Leu Ser Ala Leu Pro Gln Gly Ala Phe Gln
 325 330 335

Gly Leu Gly Glu Leu Gln Val Leu Ala Leu His Ser Asn Gly Leu Thr
 340 345 350

Ala Leu Pro Asp Gly Leu Leu Arg Gly Leu Gly Lys Leu Arg Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Arg Arg Asn Arg Leu Arg Ala Leu Pro Arg Ala Leu Phe Arg
 370 375 380

Asn Leu Ser Ser Leu Glu Ser Val Gln Leu Asp His Asn Gln Leu Glu
 385 390 395 400

Thr Leu Pro Gly Asp Val Phe Gly Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Val
 405 410 415

Leu Leu Gly His Asn Ser Trp Arg Cys Asp Cys Gly Leu Gly Pro Phe
 420 425 430

Leu Gly Trp Leu Arg Gln His Leu Gly Leu Val Gly Gly Glu Glu Pro
 435 440 445

Pro Arg Cys Ala Gly Pro Gly Ala His Ala Gly Leu Pro Leu Trp Ala
 450 455 460

Leu Pro Gly Gly Asp Ala Glu Cys Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Pro
 465 470 475 480

Arg Pro Ala Ala Asp Ser Ser Ser Glu Ala Pro Val His Pro Ala Leu
 485 490 495

Ala Pro Asn Ser Ser Glu Pro Trp Val Trp Ala Gln Pro Val Thr Thr
 500 505 510

Gly Lys Gly Gln Asp His Ser Pro Phe Trp Gly Phe Tyr Phe Leu Leu
 515 520 525

Leu Ala Val Gln Ala Met Ile Thr Val Ile Ile Val Phe Ala Met Ile
 530 535 540

Lys Ile Gly Gln Leu Phe Arg Lys Leu Ile Arg Glu Arg Ala Leu Gly
 545 550 555 560

ES 2 805 318 T3

<210> 3
 <211> 544
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

Gln Pro Phe Pro Cys Pro Pro Ala Cys Lys Cys Val Phe Arg Asp Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Cys Ser Gly Gly Asp Val Ala Arg Ile Ser Ala Leu Gly Leu
 20 25 30

Pro Thr Asn Leu Thr His Ile Leu Leu Phe Gly Met Gly Arg Gly Val
 35 40 45

Leu Gln Ser Gln Ser Phe Ser Gly Met Thr Val Leu Gln Arg Leu Met
 50 55 60

Ile Ser Asp Ser His Ile Ser Ala Val Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asp
 65 70 75 80

Leu Ile Lys Leu Lys Thr Leu Arg Leu Ser Arg Asn Lys Ile Thr His
 85 90 95

Leu Pro Gly Ala Leu Leu Asp Lys Met Val Leu Leu Glu Gln Leu Phe
 100 105 110

Leu Asp His Asn Ala Leu Arg Gly Ile Asp Gln Asn Met Phe Gln Lys
 115 120 125

Leu Val Asn Leu Gln Glu Leu Ala Leu Asn Gln Asn Gln Leu Asp Phe
 130 135 140

Leu Pro Ala Ser Leu Phe Thr Asn Leu Glu Asn Leu Lys Leu Leu Asp
 145 150 155 160

Leu Ser Gly Asn Asn Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Leu Leu Gly Ala
 165 170 175

Gln Ala Lys Leu Glu Arg Leu Leu Leu His Ser Asn Arg Leu Val Ser
 180 185 190

Leu Asp Ser Gly Leu Leu Asn Ser Leu Gly Ala Leu Thr Glu Leu Gln
 195 200 205

Phe His Arg Asn His Ile Arg Ser Ile Ala Pro Gly Ala Phe Asp Arg
 210 215 220

ES 2 805 318 T3

Leu Pro Asn Leu Ser Ser Leu Thr Leu Ser Arg Asn His Leu Ala Phe
 225 230 235 240

Leu Pro Ser Ala Leu Phe Leu His Ser His Asn Leu Thr Leu Leu Thr
 245 250 255

Leu Phe Glu Asn Pro Leu Ala Glu Leu Pro Gly Val Leu Phe Gly Glu
 260 265 270

Met Gly Gly Leu Gln Glu Leu Trp Leu Asn Arg Thr Gln Leu Arg Thr
 275 280 285

Leu Pro Ala Ala Ala Phe Arg Asn Leu Ser Arg Leu Arg Tyr Leu Gly
 290 295 300

Val Thr Leu Ser Pro Arg Leu Ser Ala Leu Pro Gln Gly Ala Phe Gln
 305 310 315 320

Gly Leu Gly Glu Leu Gln Val Leu Ala Leu His Ser Asn Gly Leu Thr
 325 330 335

Ala Leu Pro Asp Gly Leu Leu Arg Gly Leu Gly Lys Leu Arg Gln Val
 340 345 350

Ser Leu Arg Arg Asn Arg Leu Arg Ala Leu Pro Arg Ala Leu Phe Arg
 355 360 365

Asn Leu Ser Ser Leu Glu Ser Val Gln Leu Asp His Asn Gln Leu Glu
 370 375 380

Thr Leu Pro Gly Asp Val Phe Gly Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Val
 385 390 395 400

Leu Leu Gly His Asn Ser Trp Arg Cys Asp Cys Gly Leu Gly Pro Phe
 405 410 415

Leu Gly Trp Leu Arg Gln His Leu Gly Leu Val Gly Gly Glu Glu Pro
 420 425 430

Pro Arg Cys Ala Gly Pro Gly Ala His Ala Gly Leu Pro Leu Trp Ala
 435 440 445

Leu Pro Gly Gly Asp Ala Glu Cys Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Pro
 450 455 460

Arg Pro Ala Ala Asp Ser Ser Ser Glu Ala Pro Val His Pro Ala Leu
 465 470 475 480

ES 2 805 318 T3

Ala Pro Asn Ser Ser Glu Pro Trp Val Trp Ala Gln Pro Val Thr Thr
485 490 495

Gly Lys Gly Gln Asp His Ser Pro Phe Trp Gly Phe Tyr Phe Leu Leu
500 505 510

Leu Ala Val Gln Ala Met Ile Thr Val Ile Ile Val Phe Ala Met Ile
515 520 525

Lys Ile Gly Gln Leu Phe Arg Lys Leu Ile Arg Glu Arg Ala Leu Gly
530 535 540

<210> 4
5 <211> 527
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> GPV soluble con etiqueta de polihistidina en el terminal C

<400> 4

ES 2 805 318 T3

Gln Pro Phe Pro Cys Pro Pro Ala Cys Lys Cys Val Phe Arg Asp Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Cys Ser Gly Gly Asp Val Ala Arg Ile Ser Ala Leu Gly Leu
 20 25 30

Pro Thr Asn Leu Thr His Ile Leu Leu Phe Gly Met Gly Arg Gly Val
 35 40 45

Leu Gln Ser Gln Ser Phe Ser Gly Met Thr Val Leu Gln Arg Leu Met
 50 55 60

Ile Ser Asp Ser His Ile Ser Ala Val Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asp
 65 70 75 80

Leu Ile Lys Leu Lys Thr Leu Arg Leu Ser Arg Asn Lys Ile Thr His
 85 90 95

Leu Pro Gly Ala Leu Leu Asp Lys Met Val Leu Leu Glu Gln Leu Phe
 100 105 110

Leu Asp His Asn Ala Leu Arg Gly Ile Asp Gln Asn Met Phe Gln Lys
 115 120 125

Leu Val Asn Leu Gln Glu Leu Ala Leu Asn Gln Asn Gln Leu Asp Phe
 130 135 140

ES 2 805 318 T3

Leu Pro Ala Ser Leu Phe Thr Asn Leu Glu Asn Leu Lys Leu Leu Asp
 145 150 155 160

Leu Ser Gly Asn Asn Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Leu Leu Gly Ala
 165 170 175

Gln Ala Lys Leu Glu Arg Leu Leu Leu His Ser Asn Arg Leu Val Ser
 180 185 190

Leu Asp Ser Gly Leu Leu Asn Ser Leu Gly Ala Leu Thr Glu Leu Gln
 195 200 205

Phe His Arg Asn His Ile Arg Ser Ile Ala Pro Gly Ala Phe Asp Arg
 210 215 220

Leu Pro Asn Leu Ser Ser Leu Thr Leu Ser Arg Asn His Leu Ala Phe
 225 230 235 240

Leu Pro Ser Ala Leu Phe Leu His Ser His Asn Leu Thr Leu Leu Thr
 245 250 255

Leu Phe Glu Asn Pro Leu Ala Glu Leu Pro Gly Val Leu Phe Gly Glu
 260 265 270

Met Gly Gly Leu Gln Glu Leu Trp Leu Asn Arg Thr Gln Leu Arg Thr
 275 280 285

Leu Pro Ala Ala Ala Phe Arg Asn Leu Ser Arg Leu Arg Tyr Leu Gly
 290 295 300

Val Thr Leu Ser Pro Arg Leu Ser Ala Leu Pro Gln Gly Ala Phe Gln
 305 310 315 320

Gly Leu Gly Glu Leu Gln Val Leu Ala Leu His Ser Asn Gly Leu Thr
 325 330 335

Ala Leu Pro Asp Gly Leu Leu Arg Gly Leu Gly Lys Leu Arg Gln Val
 340 345 350

Ser Leu Arg Arg Asn Arg Leu Arg Ala Leu Pro Arg Ala Leu Phe Arg
 355 360 365

Asn Leu Ser Ser Leu Glu Ser Val Gln Leu Asp His Asn Gln Leu Glu
 370 375 380

Thr Leu Pro Gly Asp Val Phe Gly Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Val
 385 390 395 400

ES 2 805 318 T3

Leu Leu Gly His Asn Ser Trp Arg Cys Asp Cys Gly Leu Gly Pro Phe
 405 410 415

Leu Gly Trp Leu Arg Gln His Leu Gly Leu Val Gly Gly Glu Glu Pro
 420 425 430

Pro Arg Cys Ala Gly Pro Gly Ala His Ala Gly Leu Pro Leu Trp Ala
 435 440 445

Leu Pro Gly Gly Asp Ala Glu Cys Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Pro
 450 455 460

Arg Pro Ala Ala Asp Ser Ser Ser Glu Ala Pro Val His Pro Ala Leu
 465 470 475 480

Ala Pro Asn Ser Ser Glu Pro Trp Val Trp Ala Gln Pro Val Thr Thr
 485 490 495

Gly Lys Gly Gln Asp His Ser Pro Phe Trp Gly Phe Tyr Phe Leu Leu
 500 505 510

Leu Ala Val Gln Ala His His His His His His His His His His
 515 520 525

- <210> 5
- <211> 2215
- 5 <212> ADN
- <213> Mus musculus

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (30)..(1733)

<400> 5

ES 2 805 318 T3

tcagtcagg	gtgcagaact	gcttcagac	atg	cta	aga	agc	gcc	ctg	ctg	tcc												53
			Met	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser												
			1				5															
gcg	gtg	ctc	gca	ctc	ttg	cgt	gcc	caa	cct	ttt	ccc	tgc	ccc	aaa	acc							101
Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Arg	Ala	Gln	Pro	Phe	Pro	Cys	Pro	Lys	Thr							
	10					15					20											
tgc	aag	tgt	gtg	gtc	cgc	gat	gcc	gcg	cag	tgc	tcg	ggc	ggc	agc	gtg							149
Cys	Lys	Cys	Val	Val	Arg	Asp	Ala	Ala	Gln	Cys	Ser	Gly	Gly	Ser	Val							
25					30					35					40							
gct	cac	atc	gct	gag	cta	ggt	ctg	cct	acg	aac	ctc	aca	cac	atc	ctg							197
Ala	His	Ile	Ala	Glu	Leu	Gly	Leu	Pro	Thr	Asn	Leu	Thr	His	Ile	Leu							
				45					50						55							
ctc	ttc	cga	atg	gac	cag	ggc	ata	ttg	cgg	aac	cac	agc	ttc	agc	ggc							245
Leu	Phe	Arg	Met	Asp	Gln	Gly	Ile	Leu	Arg	Asn	His	Ser	Phe	Ser	Gly							
			60					65							70							

ES 2 805 318 T3

atg	aca	gtc	ctt	cag	cgc	ctg	atg	ctc	tca	gat	agc	cac	att	tcc	gcc	293
Met	Thr	Val	Leu	Gln	Arg	Leu	Met	Leu	Ser	Asp	Ser	His	Ile	Ser	Ala	
		75					80					85				
atc	gac	ccc	ggc	acc	ttc	aat	gac	ctg	gta	aaa	ctg	aaa	acc	ctc	agg	341
Ile	Asp	Pro	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Leu	Val	Lys	Leu	Lys	Thr	Leu	Arg	
	90					95					100					
ttg	acg	cgc	aac	aaa	atc	tct	cgt	ctt	cca	cgt	gcg	atc	ctg	gat	aag	389
Leu	Thr	Arg	Asn	Lys	Ile	Ser	Arg	Leu	Pro	Arg	Ala	Ile	Leu	Asp	Lys	
105					110					115					120	
atg	gta	ctc	ttg	gaa	cag	ctg	ttc	ttg	gac	cac	aat	gca	cta	agg	gac	437
Met	Val	Leu	Leu	Glu	Gln	Leu	Phe	Leu	Asp	His	Asn	Ala	Leu	Arg	Asp	
				125					130					135		
ctt	gat	caa	aac	ctg	ttt	cag	caa	ctg	cgt	aac	ctt	cag	gag	ctc	ggt	485
Leu	Asp	Gln	Asn	Leu	Phe	Gln	Gln	Leu	Arg	Asn	Leu	Gln	Glu	Leu	Gly	
			140					145					150			
ttg	aac	cag	aat	cag	ctc	tct	ttt	ctt	cct	gct	aac	ctt	ttc	tcg	agc	533
Leu	Asn	Gln	Asn	Gln	Leu	Ser	Phe	Leu	Pro	Ala	Asn	Leu	Phe	Ser	Ser	
		155					160					165				
ctg	aga	gaa	ctg	aag	ttg	ttg	gat	tta	tcg	cga	aac	aac	ctg	acc	cac	581
Leu	Arg	Glu	Leu	Lys	Leu	Leu	Asp	Leu	Ser	Arg	Asn	Asn	Leu	Thr	His	
	170					175					180					
ctg	ccc	aag	gga	ctg	ctt	ggg	gct	caa	ggt	aag	ctt	gag	aaa	ctg	ctg	629
Leu	Pro	Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Gln	Val	Lys	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	
185					190					195					200	
ctc	tat	tca	aac	cag	ctc	acg	tct	gtg	gat	tcg	ggg	ctg	ctg	agc	aac	677
Leu	Tyr	Ser	Asn	Gln	Leu	Thr	Ser	Val	Asp	Ser	Gly	Leu	Leu	Ser	Asn	
				205					210					215		
ctg	ggc	gcc	ctg	act	gag	ctg	cgg	ctg	gag	cgg	aat	cac	ctc	cgc	tcc	725
Leu	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Leu	Arg	Leu	Glu	Arg	Asn	His	Leu	Arg	Ser	
			220					225					230			
gta	gcc	ccg	ggt	gcc	ttc	gac	cgc	ctc	gga	aac	ctg	agc	tcc	ttg	act	773
Val	Ala	Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Arg	Leu	Gly	Asn	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	
		235					240					245				
cta	tcc	gga	aac	ctc	ctg	gag	tct	ctg	cgg	ccc	gcg	ctc	ttc	ctt	cac	821
Leu	Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Glu	Ser	Leu	Pro	Pro	Ala	Leu	Phe	Leu	His	
		250				255					260					
gtg	agc	agc	gtg	tct	cgg	ctg	act	ctg	ttc	gag	aac	ccc	ctg	gag	gag	869
Val	Ser	Ser	Val	Ser	Arg	Leu	Thr	Leu	Phe	Glu	Asn	Pro	Leu	Glu	Glu	
265					270					275					280	
ctc	ccg	gac	gtg	ttg	ttc	ggg	gag	atg	gcc	ggc	ctg	cgg	gag	ctg	tgg	917
Leu	Pro	Asp	Val	Leu	Phe	Gly	Glu	Met	Ala	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Trp	
				285					290					295		
ctg	aac	ggc	acc	cac	ctg	agc	acg	ctg	ccc	gcc	gct	gcc	ttc	cgc	aac	965
Leu	Asn	Gly	Thr	His	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Phe	Arg	Asn	
			300					305					310			
ctg	agc	ggc	ttg	cag	acg	ctg	ggg	ctg	acg	cgg	aac	ccg	cgc	ctg	agc	1013
Leu	Ser	Gly	Leu	Gln	Thr	Leu	Gly	Leu	Thr	Arg	Asn	Pro	Arg	Leu	Ser	

ES 2 805 318 T3

315	320	325	
gcg ctc ccg cgc ggc	gtg ttc cag ggc	cta cgg gag	ctg cgc gtg ctc
Ala Leu Pro Arg Gly	Val Phe Gln Gly	Leu Arg Glu	Leu Arg Val Leu
330	335	340	1061
gcg ctg cac acc aac	gcc ctg gcg gag	ctg cgg gac	gac gcg ctg cgc
Ala Leu His Thr Asn	Ala Leu Ala Glu	Leu Arg Asp	Asp Asp Ala Leu Arg
345	350	355	1109
ggc ctc ggg cac ctg	cgc cag gtg tcg	ctg cgc cac	aac cgg ctg cgg
Gly Leu Gly His Leu	Arg Gln Val Ser	Leu Arg His	Asn Arg Leu Arg
365	370	375	1157
gcc ctg ccc cgc acg	ctc ttc cgc aac	ctc agc agc	ctc gag agc gtg
Ala Leu Pro Arg Thr	Leu Phe Arg Asn	Leu Ser Ser	Leu Glu Ser Val
380	385	390	1205
cag cta gag cac aac	cag ctg gag acg	ctg cca gga	gac gtg ttc gcg
Gln Leu Glu His Asn	Gln Leu Glu Thr	Leu Pro Gly	Asp Val Phe Ala
395	400	405	1253
gct ctg ccc cag ctg	acc cag gtc ctg	ctg ggt cac	aac ccc tgg ctc
Ala Leu Pro Gln Leu	Thr Gln Val Leu	Leu Leu Gly	His Asn Pro Trp Leu
410	415	420	1301
tgc gac tgt ggc ctg	tgg ccc ttc ctc	cag tgg ctg	cgg cat cac ccg
Cys Asp Cys Gly Leu	Trp Pro Phe Leu	Gln Trp Leu	Arg His His Pro
425	430	435	1349
gac atc ctg ggc cga	gac gag ccc ccg	cag tgc cgt	ggc ccg gag cca
Asp Ile Leu Gly Arg	Asp Glu Pro Pro	Gln Cys Arg	Gly Pro Glu Pro
445	450	455	1397
cgc gcc agc ctg tcg	ttc tgg gag ctg	ctg cag ggt	gac ccg tgg tgc
Arg Ala Ser Leu Ser	Phe Trp Glu Leu	Leu Leu Gln	Gly Asp Pro Trp Cys
460	465	470	1445
ccg gat cct cgc agc	ctg cct ctc gac	cct cca acc	gaa aat gct ctg
Pro Asp Pro Arg Ser	Leu Pro Leu Asp	Pro Pro Thr	Glu Asn Ala Leu
475	480	485	1493
gaa gcc ccg gtt ccg	tcc tgg ctg cct	aac agc tgg	cag tcc cag acg
Glu Ala Pro Val Pro	Ser Trp Leu Pro	Asn Ser Trp	Gln Ser Gln Thr
490	495	500	1541
tgg gcc cag ctg gtg	gcc agg ggt gaa	agt ccc aat	aac agg ctc tac
Trp Ala Gln Leu Val	Ala Arg Gly Glu	Ser Pro Asn	Asn Arg Leu Tyr
505	510	515	1589
tgg ggt ctt tat att	ctg ctt cta gta	gcc cag gcc	atc ata gcc gcg
Trp Gly Leu Tyr Ile	Leu Leu Leu Val	Ala Gln Ala	Ile Ile Ala Ala
525	530	535	1637
ttc atc gtg ttt gcc	atg att aaa atc	ggc cag ctg	ttt cga aca tta
Phe Ile Val Phe Ala	Met Ile Lys Ile	Gly Gln Leu	Phe Arg Thr Leu
540	545	550	1685
atc aga gag aag ctc	ttg tta gag gca	atg gga aaa	tcg tgt aac taa
Ile Arg Glu Lys Leu	Leu Leu Leu Glu	Ala Met Gly	Lys Ser Cys Asn
555	560	565	1733
tgaaactgac cagagcattg	tggacggggc cccaaggaga	atgcagtcag gatgctggcg	1793

ES 2 805 318 T3

tgccattaca ctatttccca ggccttttct cctctcccgt gctcttagtg tctcttcttc	1853
tcccctctct tcagaagtag cttttgtaaa tcgctactgc tttctagcct ggcctggggt	1913
acctcctctg ctgttagttt caagggggct gaggggggg gttcgacggg acttggetca	1973
tcaggtccaa ctgtgcagcg ctgggtgcct agtggagaga ggagcccttt cttggtttct	2033
gaatttgagg acacatcctg ccagtgggca agacctctcc gggaccacgc aagggtgag	2093
taacatttgc tgaaggaaca ccggcttaaa acgaacccta ggtccaagag atgaaggctc	2153
ttcccaaaat aaaggtggag tgttcttgtc cctttacctg aaaggaaaa aaaaaaaaa	2213
aa	2215

5 <210> 6
<211> 567
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

ES 2 805 318 T3

Met Leu Arg Ser Ala Leu Leu Ser Ala Val Leu Ala Leu Leu Arg Ala
 1 5 10 15

Gln Pro Phe Pro Cys Pro Lys Thr Cys Lys Cys Val Val Arg Asp Ala
 20 25 30

Ala Gln Cys Ser Gly Gly Ser Val Ala His Ile Ala Glu Leu Gly Leu
 35 40 45

Pro Thr Asn Leu Thr His Ile Leu Leu Phe Arg Met Asp Gln Gly Ile
 50 55 60

Leu Arg Asn His Ser Phe Ser Gly Met Thr Val Leu Gln Arg Leu Met
 65 70 75 80

Leu Ser Asp Ser His Ile Ser Ala Ile Asp Pro Gly Thr Phe Asn Asp
 85 90 95

Leu Val Lys Leu Lys Thr Leu Arg Leu Thr Arg Asn Lys Ile Ser Arg
 100 105 110

Leu Pro Arg Ala Ile Leu Asp Lys Met Val Leu Leu Glu Gln Leu Phe
 115 120 125

Leu Asp His Asn Ala Leu Arg Asp Leu Asp Gln Asn Leu Phe Gln Gln
 130 135 140

Leu Arg Asn Leu Gln Glu Leu Gly Leu Asn Gln Asn Gln Leu Ser Phe
 145 150 155 160

ES 2 805 318 T3

Leu Pro Ala Asn Leu Phe Ser Ser Leu Arg Glu Leu Lys Leu Leu Asp
 165 170 175

Leu Ser Arg Asn Asn Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Leu Leu Gly Ala
 180 185 190

Gln Val Lys Leu Glu Lys Leu Leu Leu Tyr Ser Asn Gln Leu Thr Ser
 195 200 205

Val Asp Ser Gly Leu Leu Ser Asn Leu Gly Ala Leu Thr Glu Leu Arg
 210 215 220

Leu Glu Arg Asn His Leu Arg Ser Val Ala Pro Gly Ala Phe Asp Arg
 225 230 235 240

Leu Gly Asn Leu Ser Ser Leu Thr Leu Ser Gly Asn Leu Leu Glu Ser
 245 250 255

Leu Pro Pro Ala Leu Phe Leu His Val Ser Ser Val Ser Arg Leu Thr
 260 265 270

Leu Phe Glu Asn Pro Leu Glu Glu Leu Pro Asp Val Leu Phe Gly Glu
 275 280 285

Met Ala Gly Leu Arg Glu Leu Trp Leu Asn Gly Thr His Leu Ser Thr
 290 295 300

Leu Pro Ala Ala Ala Phe Arg Asn Leu Ser Gly Leu Gln Thr Leu Gly
 305 310 315 320

Leu Thr Arg Asn Pro Arg Leu Ser Ala Leu Pro Arg Gly Val Phe Gln
 325 330 335

Gly Leu Arg Glu Leu Arg Val Leu Ala Leu His Thr Asn Ala Leu Ala
 340 345 350

Glu Leu Arg Asp Asp Ala Leu Arg Gly Leu Gly His Leu Arg Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Arg His Asn Arg Leu Arg Ala Leu Pro Arg Thr Leu Phe Arg
 370 375 380

Asn Leu Ser Ser Leu Glu Ser Val Gln Leu Glu His Asn Gln Leu Glu
 385 390 395 400

Thr Leu Pro Gly Asp Val Phe Ala Ala Leu Pro Gln Leu Thr Gln Val

ES 2 805 318 T3

				405						410						415
Leu	Leu	Gly	His	Asn	Pro	Trp	Leu	Cys	Asp	Cys	Gly	Leu	Trp	Pro	Phe	
			420					425					430			
Leu	Gln	Trp	Leu	Arg	His	His	Pro	Asp	Ile	Leu	Gly	Arg	Asp	Glu	Pro	
		435					440					445				
Pro	Gln	Cys	Arg	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Trp	Glu	
	450					455					460					
Leu	Leu	Gln	Gly	Asp	Pro	Trp	Cys	Pro	Asp	Pro	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	
465					470				475						480	
Asp	Pro	Pro	Thr	Glu	Asn	Ala	Leu	Glu	Ala	Pro	Val	Pro	Ser	Trp	Leu	
				485					490					495		
Pro	Asn	Ser	Trp	Gln	Ser	Gln	Thr	Trp	Ala	Gln	Leu	Val	Ala	Arg	Gly	
			500					505					510			
Glu	Ser	Pro	Asn	Asn	Arg	Leu	Tyr	Trp	Gly	Leu	Tyr	Ile	Leu	Leu	Leu	
		515					520					525				
Val	Ala	Gln	Ala	Ile	Ile	Ala	Ala	Phe	Ile	Val	Phe	Ala	Met	Ile	Lys	
	530					535					540					
Ile	Gly	Gln	Leu	Phe	Arg	Thr	Leu	Ile	Arg	Glu	Lys	Leu	Leu	Leu	Glu	
545					550					555					560	
Ala	Met	Gly	Lys	Ser	Cys	Asn										
				565												

<210> 7
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 7

ES 2 805 318 T3

Gln Pro Phe Pro Cys Pro Lys Thr Cys Lys Cys Val Val Arg Asp Ala
1 5 10 15

Ala Gln Cys Ser Gly Gly Ser Val Ala His Ile Ala Glu Leu Gly Leu
20 25 30

Pro Thr Asn Leu Thr His Ile Leu Leu Phe Arg Met Asp Gln Gly Ile
35 40 45

Leu Arg Asn His Ser Phe Ser Gly Met Thr Val Leu Gln Arg Leu Met

ES 2 805 318 T3

50						55										60
Leu	Ser	Asp	Ser	His	Ile	Ser	Ala	Ile	Asp	Pro	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	
65					70					75					80	
Leu	Val	Lys	Leu	Lys	Thr	Leu	Arg	Leu	Thr	Arg	Asn	Lys	Ile	Ser	Arg	
				85					90					95		
Leu	Pro	Arg	Ala	Ile	Leu	Asp	Lys	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Gln	Leu	Phe	
			100					105					110			
Leu	Asp	His	Asn	Ala	Leu	Arg	Asp	Leu	Asp	Gln	Asn	Leu	Phe	Gln	Gln	
		115					120					125				
Leu	Arg	Asn	Leu	Gln	Glu	Leu	Gly	Leu	Asn	Gln	Asn	Gln	Leu	Ser	Phe	
	130					135					140					
Leu	Pro	Ala	Asn	Leu	Phe	Ser	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Lys	Leu	Leu	Asp	
145					150					155					160	
Leu	Ser	Arg	Asn	Asn	Leu	Thr	His	Leu	Pro	Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	
				165					170					175		
Gln	Val	Lys	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Leu	Tyr	Ser	Asn	Gln	Leu	Thr	Ser	
			180					185					190			
Val	Asp	Ser	Gly	Leu	Leu	Ser	Asn	Leu	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Leu	Arg	
		195					200					205				
Leu	Glu	Arg	Asn	His	Leu	Arg	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Arg	
	210					215					220					
Leu	Gly	Asn	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Glu	Ser	
225					230					235					240	
Leu	Pro	Pro	Ala	Leu	Phe	Leu	His	Val	Ser	Ser	Val	Ser	Arg	Leu	Thr	
				245					250					255		
Leu	Phe	Glu	Asn	Pro	Leu	Glu	Glu	Leu	Pro	Asp	Val	Leu	Phe	Gly	Glu	
			260					265					270			
Met	Ala	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Trp	Leu	Asn	Gly	Thr	His	Leu	Ser	Thr	
		275					280					285				
Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Phe	Arg	Asn	Leu	Ser	Gly	Leu	Gln	Thr	Leu	Gly	
	290					295					300					

ES 2 805 318 T3

Leu Thr Arg Asn Pro Arg Leu Ser Ala Leu Pro Arg Gly Val Phe Gln
 305 310 315 320

 Gly Leu Arg Glu Leu Arg Val Leu Ala Leu His Thr Asn Ala Leu Ala
 325 330 335

 Glu Leu Arg Asp Asp Ala Leu Arg Gly Leu Gly His Leu Arg Gln Val
 340 345 350

 Ser Leu Arg His Asn Arg Leu Arg Ala Leu Pro Arg Thr Leu Phe Arg
 355 360 365

 Asn Leu Ser Ser Leu Glu Ser Val Gln Leu Glu His Asn Gln Leu Glu
 370 375 380

 Thr Leu Pro Gly Asp Val Phe Ala Ala Leu Pro Gln Leu Thr Gln Val
 385 390 395 400

 Leu Leu Gly His Asn Pro Trp Leu Cys Asp Cys Gly Leu Trp Pro Phe
 405 410 415

 Leu Gln Trp Leu Arg His His Pro Asp Ile Leu Gly Arg Asp Glu Pro
 420 425 430

 Pro Gln Cys Arg Gly Pro Glu Pro Arg Ala Ser Leu Ser Phe Trp Glu
 435 440 445

 Leu Leu Gln Gly Asp Pro Trp Cys Pro Asp Pro Arg Ser Leu Pro Leu
 450 455 460

 Asp Pro Pro Thr Glu Asn Ala Leu Glu Ala Pro Val Pro Ser Trp Leu
 465 470 475 480

 Pro Asn Ser Trp Gln Ser Gln Thr Trp Ala Gln Leu Val Ala Arg Gly
 485 490 495

 Glu Ser Pro Asn Asn Arg Leu Tyr Trp Gly Leu Tyr Ile Leu Leu Leu
 500 505 510

 Val Ala Gln Ala Ile Ile Ala Ala Phe Ile Val Phe Ala Met Ile Lys
 515 520 525

 Ile Gly Gln Leu Phe Arg Thr Leu Ile Arg Glu Lys Leu Leu Leu Glu
 530 535 540

 Ala Met Gly Lys Ser Cys Asn
 545 550

ES 2 805 318 T3

<210> 8
<211> 527
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Glicoproteína V murina soluble con etiqueta FLAG en el terminal C

<400> 8

ES 2 805 318 T3

Gln Pro Phe Pro Cys Pro Lys Thr Cys Lys Cys Val Val Arg Asp Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Cys Ser Gly Gly Ser Val Ala His Ile Ala Glu Leu Gly Leu
 20 25 30

Pro Thr Asn Leu Thr His Ile Leu Leu Phe Arg Met Asp Gln Gly Ile
 35 40 45

Leu Arg Asn His Ser Phe Ser Gly Met Thr Val Leu Gln Arg Gln Met
 50 55 60

Leu Ser Asp Ser His Ile Ser Ala Ile Asp Pro Gly Thr Phe Asn Asp
 65 70 75 80

Leu Val Lys Leu Lys Thr Leu Arg Leu Thr Arg Asn Lys Ile Ser Arg
 85 90 95

Leu Pro Arg Ala Ile Leu Asp Lys Met Val Leu Leu Glu Gln Leu Phe
 100 105 110

Leu Asp His Asn Ala Leu Arg Asp Leu Asp Gln Asn Leu Phe Gln Gln
 115 120 125

Leu Arg Asn Leu Gln Glu Leu Gly Leu Asn Gln Asn Gln Leu Ser Phe
 130 135 140

Leu Pro Ala Asn Leu Phe Ser Ser Leu Arg Glu Leu Lys Leu Leu Asp
 145 150 155 160

Leu Ser Arg Asn Asn Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Leu Leu Gly Ala
 165 170 175

Gln Val Lys Leu Glu Lys Leu Leu Leu Tyr Ser Asn Gln Leu Thr Ser
 180 185 190

Val Asp Ser Gly Leu Leu Ser Asn Leu Gly Ala Leu Thr Glu Leu Arg
 195 200 205

ES 2 805 318 T3

Leu Glu Arg Asn His Leu Arg Ser Val Ala Pro Gly Ala Phe Asp Arg
 210 215 220

Leu Gly Asn Leu Ser Ser Leu Thr Leu Ser Gly Asn Leu Leu Glu Ser
 225 230 240

Leu Pro Pro Ala Leu Phe Leu His Val Ser Ser Val Ser Arg Leu Thr
 245 250 255

Leu Phe Glu Asn Pro Leu Glu Glu Leu Pro Asp Val Leu Phe Gly Glu
 260 265 270

Met Ala Gly Leu Arg Glu Leu Trp Leu Asn Gly Thr His Leu Ser Thr
 275 280 285

Leu Pro Ala Ala Ala Phe Arg Asn Leu Ser Gly Leu Gln Thr Leu Gly
 290 295 300

Leu Thr Arg Asn Pro Arg Leu Ser Ala Leu Pro Arg Gly Val Phe Gln
 305 310 315 320

Gly Leu Arg Glu Leu Arg Val Leu Gly Leu His Thr Asn Ala Leu Ala
 325 330 335

Glu Leu Arg Asp Asp Ala Leu Arg Gly Leu Gly His Leu Arg Gln Val
 340 345 350

Ser Leu Arg His Asn Arg Leu Arg Ala Leu Pro Arg Thr Leu Phe Arg
 355 360 365

Asn Leu Ser Ser Leu Glu Ser Val Gln Leu Glu His Asn Gln Leu Glu
 370 375 380

Thr Leu Pro Gly Asp Val Phe Ala Ala Leu Pro Gln Leu Thr Gln Val
 385 390 395 400

Leu Leu Gly His Asn Pro Trp Leu Cys Asp Cys Gly Leu Trp Arg Phe
 405 410 415

Leu Gln Trp Leu Arg His His Pro Asp Ile Leu Gly Arg Asp Glu Pro
 420 425 430

Pro Gln Cys Arg Gly Pro Glu Pro Arg Ala Ser Leu Ser Phe Trp Glu
 435 440 445

Leu Leu Gln Gly Asp Pro Trp Cys Pro Asp Pro Arg Ser Leu Pro Leu
 450 455 460

ES 2 805 318 T3

Asp Pro Pro Thr Glu Asn Ala Leu Glu Ala Pro Val Pro Ser Trp Leu
465 470 475 480

Pro Asn Ser Trp Gln Ser Gln Thr Trp Ala Gln Leu Val Ala Arg Gly
485 490 495

Glu Ser Pro Asn Asn Arg Leu Glu Cys Gly Arg Asn Pro Ala Phe Leu
500 505 510

Tyr Lys Val Val Leu Glu Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
515 520 525

<210> 9
<211> 1078
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> GPV soluble humana fusionada a albúmina a través de un conector (sin péptido señal)

10

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELANEA
<222> (1)..(457)
<223> GPV humana

15

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELANEA
<222> (458)..(463)
<223> sitio de escisión de trombina

20

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELANEA
<222> (464)..(493)
<223> Conector de GGS

25

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELANEA
<222> (494)..(1078)
<223> albúmina humana

30

<400> 9

ES 2 805 318 T3

Gln Pro Phe Pro Cys Pro Pro Ala Cys Lys Cys Val Phe Arg Asp Ala
1 5 10 15

Ala Gln Cys Ser Gly Gly Asp Val Ala Arg Ile Ser Ala Leu Gly Leu
20 25 30

Pro Thr Asn Leu Thr His Ile Leu Leu Phe Gly Met Gly Arg Gly Val
35 40 45

Leu Gln Ser Gln Ser Phe Ser Gly Met Thr Val Leu Gln Arg Leu Met
50 55 60

ES 2 805 318 T3

Ile Ser Asp Ser His Ile Ser Ala Val Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asp
65 70 75 80

Leu Ile Lys Leu Lys Thr Leu Arg Leu Ser Arg Asn Lys Ile Thr His
85 90 95

Leu Pro Gly Ala Leu Leu Asp Lys Met Val Leu Leu Glu Gln Leu Phe
100 105 110

Leu Asp His Asn Ala Leu Arg Gly Ile Asp Gln Asn Met Phe Gln Lys
115 120 125

Leu Val Asn Leu Gln Glu Leu Ala Leu Asn Gln Asn Gln Leu Asp Phe
130 135 140

Leu Pro Ala Ser Leu Phe Thr Asn Leu Glu Asn Leu Lys Leu Leu Asp
145 150 155 160

Leu Ser Gly Asn Asn Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Leu Leu Gly Ala
165 170 175

Gln Ala Lys Leu Glu Arg Leu Leu Leu His Ser Asn Arg Leu Val Ser
180 185 190

Leu Asp Ser Gly Leu Leu Asn Ser Leu Gly Ala Leu Thr Glu Leu Gln
195 200 205

Phe His Arg Asn His Ile Arg Ser Ile Ala Pro Gly Ala Phe Asp Arg
210 215 220

Leu Pro Asn Leu Ser Ser Leu Thr Leu Ser Arg Asn His Leu Ala Phe
225 230 235 240

Leu Pro Ser Ala Leu Phe Leu His Ser His Asn Leu Thr Leu Leu Thr
245 250 255

Leu Phe Glu Asn Pro Leu Ala Glu Leu Pro Gly Val Leu Phe Gly Glu
260 265 270

Met Gly Gly Leu Gln Glu Leu Trp Leu Asn Arg Thr Gln Leu Arg Thr
275 280 285

Leu Pro Ala Ala Ala Phe Arg Asn Leu Ser Arg Leu Arg Tyr Leu Gly
290 295 300

Val Thr Leu Ser Pro Arg Leu Ser Ala Leu Pro Gln Gly Ala Phe Gln

ES 2 805 318 T3

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

Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn
580 585 590

Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu
595 600 605

Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu
610 615 620

Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro
625 630 635 640

Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala
645 650 655

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

Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys
675 680 685

Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe
690 695 700

Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu
705 710 715 720

Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr
725 730 735

Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp
740 745 750

Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu
755 760 765

Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala
770 775 780

Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala
785 790 795 800

Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys
805 810 815

ES 2 805 318 T3

Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro
 820 825 830

Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr
 835 840 845

Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala
 850 855 860

Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu
 865 870 875 880

Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe
 885 890 895

Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
 900 905 910

Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser
 915 920 925

Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp
 930 935 940

Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr
 945 950 955 960

Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn
 965 970 975

Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro
 980 985 990

Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr
 995 1000 1005

Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val
 1010 1015 1020

Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
 1025 1030 1035

Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 1040 1045 1050

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu
 1055 1060 1065

ES 2 805 318 T3

Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
1070 1075

5 <210> 10
<211> 460
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELANEA
<222> (1)..(460)
<223> fragmento de GPV humana obtenida de escisión de trombina (GPVfl)

15 <400> 10

ES 2 805 318 T3

Gln Pro Phe Pro Cys Pro Pro Ala Cys Lys Cys Val Phe Arg Asp Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Cys Ser Gly Gly Asp Val Ala Arg Ile Ser Ala Leu Gly Leu
 20 25 30

Pro Thr Asn Leu Thr His Ile Leu Leu Phe Gly Met Gly Arg Gly Val
 35 40 45

Leu Gln Ser Gln Ser Phe Ser Gly Met Thr Val Leu Gln Arg Leu Met
 50 55 60

Ile Ser Asp Ser His Ile Ser Ala Val Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asp
 65 70 75 80

Leu Ile Lys Leu Lys Thr Leu Arg Leu Ser Arg Asn Lys Ile Thr His
 85 90 95

Leu Pro Gly Ala Leu Leu Asp Lys Met Val Leu Leu Glu Gln Leu Phe
 100 105 110

Leu Asp His Asn Ala Leu Arg Gly Ile Asp Gln Asn Met Phe Gln Lys
 115 120 125

Leu Val Asn Leu Gln Glu Leu Ala Leu Asn Gln Asn Gln Leu Asp Phe
 130 135 140

Leu Pro Ala Ser Leu Phe Thr Asn Leu Glu Asn Leu Lys Leu Leu Asp
 145 150 155 160

Leu Ser Gly Asn Asn Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Leu Leu Gly Ala
 165 170 175

ES 2 805 318 T3

Gln Ala Lys Leu Glu Arg Leu Leu Leu His Ser Asn Arg Leu Val Ser
 180 185 190

Leu Asp Ser Gly Leu Leu Asn Ser Leu Gly Ala Leu Thr Glu Leu Gln
 195 200 205

Phe His Arg Asn His Ile Arg Ser Ile Ala Pro Gly Ala Phe Asp Arg
 210 215 220

Leu Pro Asn Leu Ser Ser Leu Thr Leu Ser Arg Asn His Leu Ala Phe
 225 230 235 240

Leu Pro Ser Ala Leu Phe Leu His Ser His Asn Leu Thr Leu Leu Thr
 245 250 255

Leu Phe Glu Asn Pro Leu Ala Glu Leu Pro Gly Val Leu Phe Gly Glu
 260 265 270

Met Gly Gly Leu Gln Glu Leu Trp Leu Asn Arg Thr Gln Leu Arg Thr
 275 280 285

Leu Pro Ala Ala Ala Phe Arg Asn Leu Ser Arg Leu Arg Tyr Leu Gly
 290 295 300

Val Thr Leu Ser Pro Arg Leu Ser Ala Leu Pro Gln Gly Ala Phe Gln
 305 310 315 320

Gly Leu Gly Glu Leu Gln Val Leu Ala Leu His Ser Asn Gly Leu Thr
 325 330 335

Ala Leu Pro Asp Gly Leu Leu Arg Gly Leu Gly Lys Leu Arg Gln Val
 340 345 350

Ser Leu Arg Arg Asn Arg Leu Arg Ala Leu Pro Arg Ala Leu Phe Arg
 355 360 365

Asn Leu Ser Ser Leu Glu Ser Val Gln Leu Asp His Asn Gln Leu Glu
 370 375 380

Thr Leu Pro Gly Asp Val Phe Gly Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Val
 385 390 395 400

Leu Leu Gly His Asn Ser Trp Arg Cys Asp Cys Gly Leu Gly Pro Phe
 405 410 415

Leu Gly Trp Leu Arg Gln His Leu Gly Leu Val Gly Gly Glu Glu Pro
 420 425 430

ES 2 805 318 T3

Pro Arg Cys Ala Gly Pro Gly Ala His Ala Gly Leu Pro Leu Trp Ala
435 440 445

Leu Pro Gly Gly Asp Ala Glu Cys Pro Gly Pro Arg
450 455 460

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido soluble que comprende una glicoproteína V modificada (GPV) que carece de un dominio transmembrana funcional para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad trombótica en un sujeto, dicho tratamiento o prevención comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de dicho polipéptido soluble, en el que el polipéptido soluble es incapaz de integrarse en una membrana celular a través de dicho dominio transmembrana, en el que el término GPV denota una proteína que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con respecto a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID No: 3.
2. El polipéptido soluble para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad trombótica se selecciona del grupo que consiste en afecciones tromboinflamatorias, trombosis venosa, trombosis arterial, trombosis capilar, trombosis de vena porta, trombosis de vena renal, trombosis de vena yugular, trombosis del seno venoso cerebral, formación de trombos durante o después de contactar sangre con una superficie artificial, en particular oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO), aterosclerosis, artritis, coagulopatía, trombosis venosa profunda (DVT), coagulopatía intravascular diseminada (DIC), un tromboembolismo crónico o agudo, tromboembolismo pulmonar, síndrome de Budd-Chiari, enfermedades de Paget-Schroetter, accidente cerebrovascular e infarto de miocardio.
3. El polipéptido soluble para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha GPV modificada es una GPV truncada.
4. El polipéptido soluble para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha GPV modificada consiste en un fragmento del dominio extracelular de una GPV nativa, en el que dicho fragmento carece del dominio transmembrana de dicha GPV nativa.
5. El polipéptido soluble para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha GPV nativa consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3.
6. El polipéptido soluble para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho polipéptido soluble es un polipéptido que no se produce naturalmente.
7. El polipéptido soluble para uso de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además un resto que prolonga la semivida.
8. El polipéptido soluble para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha resto que prolonga la semivida se conjuga con dicha GPV modificada.
9. El polipéptido soluble para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho resto que prolonga la semivida se selecciona del grupo que consiste en hidroxietilalmidón (HES), polietilenglicol (PEG), ácidos polisialícos (PSA) y ligandos de unión a albúmina, por ejemplo, cadenas de ácidos grasos.
10. El polipéptido soluble para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho resto que prolonga la semivida es una secuencia de aminoácidos heteróloga fusionada a dicha GPV modificada, ya sea directamente o mediante un conector.
11. El polipéptido soluble para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la secuencia de aminoácidos heteróloga que prolonga la semivida comprende o consiste en un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en albúmina y un fragmento de la misma que tiene una longitud de al menos 100 aminoácidos, regiones constantes de inmunoglobulina y fragmentos de la misma, en particular el fragmento Fc, la transferrina y sus fragmentos, el péptido del terminal C de la gonadotropina coriónica humana, cadenas aleatorias solvatadas con gran volumen hidrodinámico (XTEN), repeticiones de homo-aminoácidos (HAP), repeticiones de prolina-alanina-serina (PAS), afamina, alfafetoproteína, proteína de unión a la vitamina D, polipéptidos capaces de unirse en condiciones fisiológicas a regiones constantes de albúmina o inmunoglobulina, y combinaciones de los mismos.
12. El polipéptido soluble para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho polipéptido soluble se puede obtener mediante expresión recombinante en células de mamífero.
13. El polipéptido soluble para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho tratamiento y/o prevención comprende además administrar a dicho sujeto un fármaco antiplaquetario o anticoagulante.
14. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido soluble como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en la que dicho polipéptido soluble no consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10.

5 16. Un procedimiento para preparar el polipéptido soluble de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende expresar un ácido nucleico que codifica el polipéptido soluble como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en una célula de mamífero, y recuperar el polipéptido soluble del medio de cultivo.

10 17. Un polipéptido soluble como se define en la reivindicación 6, en el que la glicoproteína V modificada (GPV) es una GPV soluble no natural.

18. Un kit farmacéutico que comprende (i) un polipéptido soluble de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y (ii) un fármaco antiplaquetario o anticoagulante distinto de dicho polipéptido soluble.

Figura 1

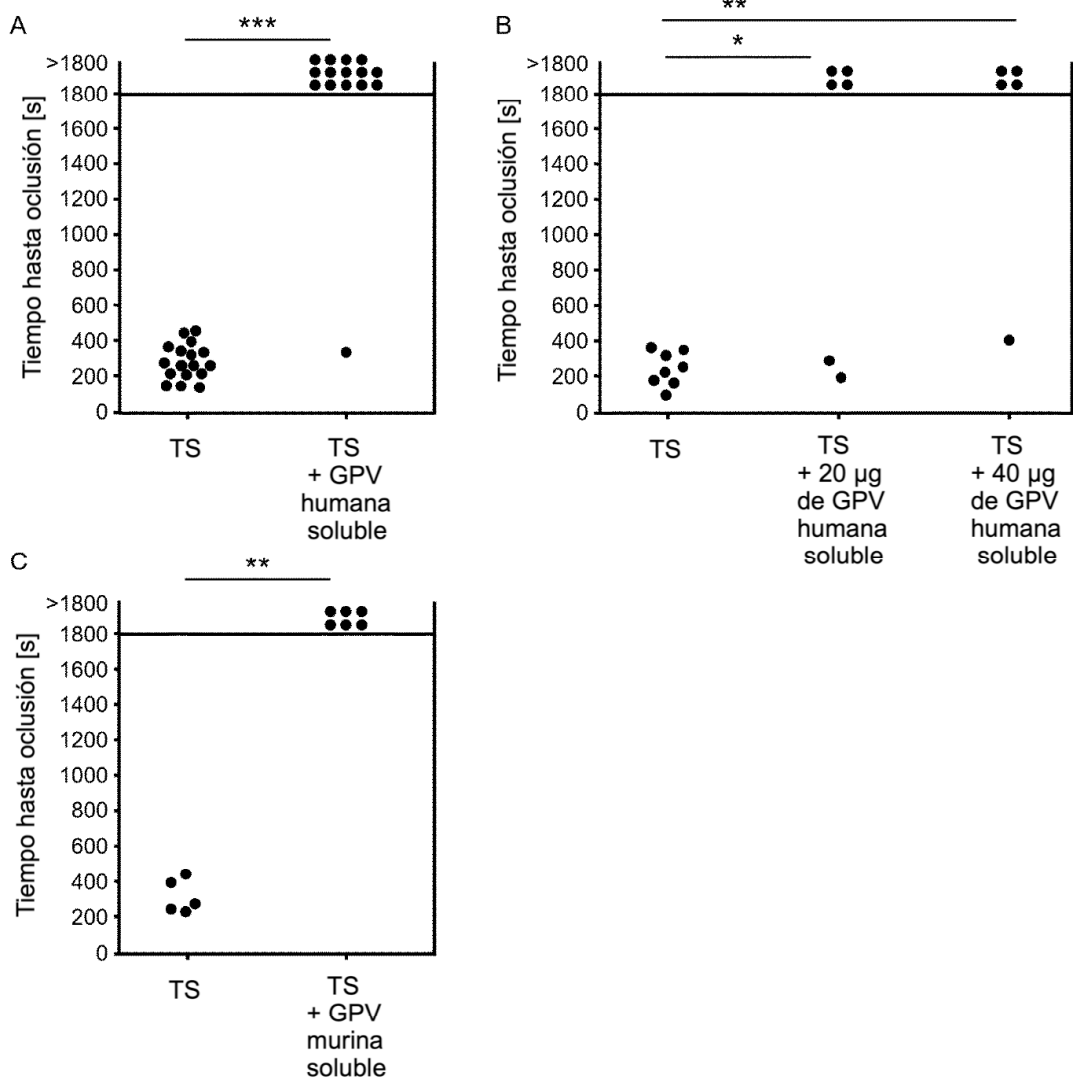


Figura 2

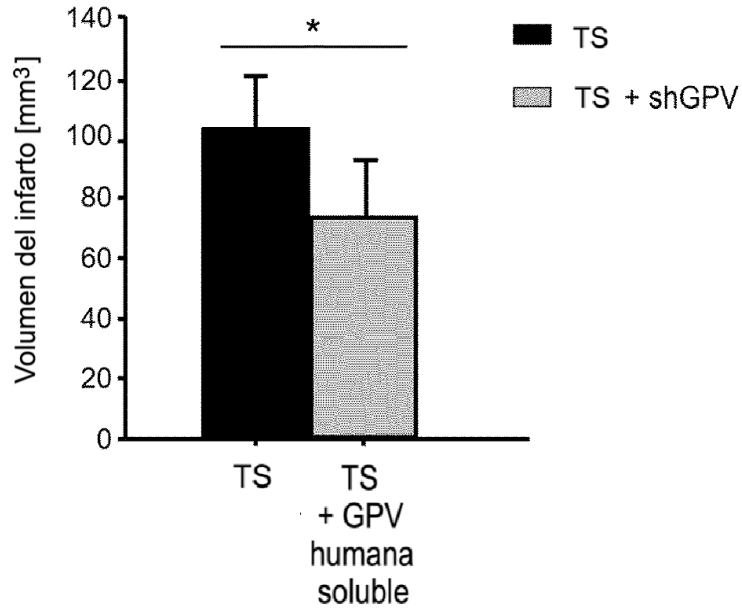


Figura 3

Tiempo de sangrado de la cola: TS + GPV humana soluble

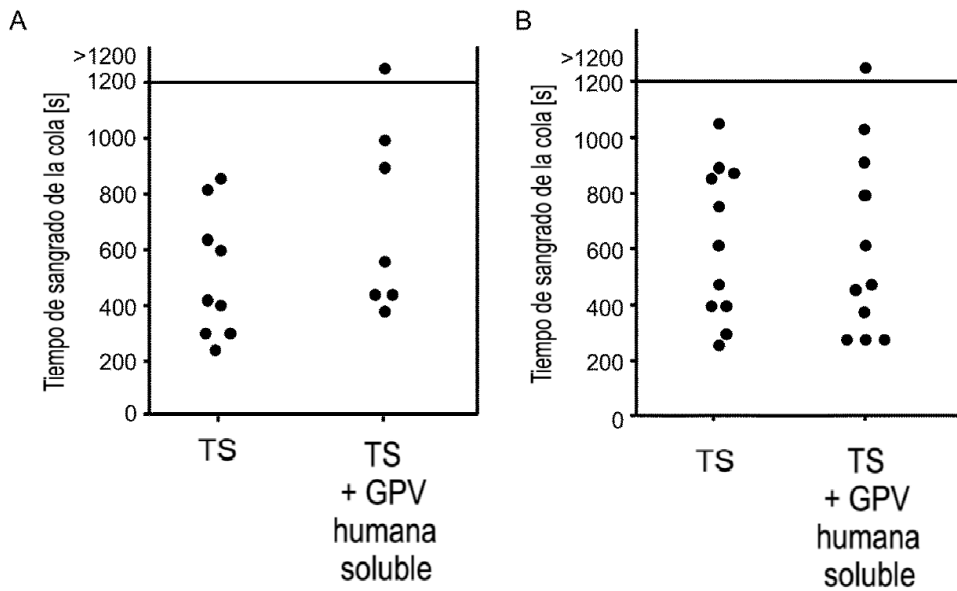


Figura 4

