SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-127271- -00009-0000
Fecha: 2013-04-30 15:35:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 808

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7
No. 13-109382- -00000-0000
Fecha: 2013-04-30 15:35:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 808

Industria

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN DIVISIONAL EXP:10-127.271

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TITULO:** **POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR VII QUE SE MODIFICAN Y USOS DE LOS MISMOS**

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL C12N 9/64

71. SOLICITANTE: **CATALYST BIOSCIENCES, INC.**

DOMICILIO: California, Estados Unidos de América.

74. APODERADO **DILIA RODRIGUEZ D´ALEMAN**

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-127271- -00009-0000
Fecha: 2013-04-30 15:35:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 808

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7
No. 13-109382- -00000-0000
Fecha: 2013-04-30 15:35:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 808

DIRECCIÓN DE NU
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y

1. Identificación del Tramite

[ ] **Conversión** [X] **División** [ ] **Fusión**

[X] Patente de Invención
[ ] Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

Persona Natural [ ] Persona Jurídica [X]

CATALYST BIOSCIENCES, INC.
Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro [ ] Pequeña [ ] Mediana [ ] Otra [ ]

Documento de identificación: [ ] C.C. [ ] C.E. [ ] NIT [ ] Otro Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular		Ciudad
Estados Unidos de América	260 Littlefield Avenue South San Francisco,		California 94080,
Dirección electrónica	No. Fax		Número telefónico

[ ] **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

RODRÍGUEZ D'ALEMAN DILIA MARÍA	C.C. 41.654.882	20824 CSJ
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia		Bogotá D.C.
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
clarkemodet@clarkemodet.com.co	6350824	6181088

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

P-3735

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente_____ _____ _____ De: _____ A: _____	Expediente _____ De: _____ A: _____	Expediente_____ _____ _____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No. **Fecha**

6. Anexos

- ☐ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
- ☐ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN	
Nombre y apellidos	Firma
C.C. 41.654.882	**Tarjeta Profesional 20824 CSJ**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	**TIPO DE SOLICITUD**	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	**PCT/US2009/002248**	**Fecha**	**10 de Abril de 2009**
Publicación Internacional No.	**WO 2009/126307 A3**	**Fecha**	**15 de Octubre de 2009**

3 TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)

POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR VII QUE SE MODIFICAN Y USOS DE LOS MISMOS

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C12N 9/64

5 SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
CATALYST BIOSCIENCES, INC.			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN: 260 Littlefield Avenue South San Francisco, **No. TELÉFONO:**

CIUDAD: California 94080, **CORREO ELECTRONICO:**

PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América **LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estados Unidos de América**

7 INVENTOR (ES)

APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.MADISON,	**Edwin, L.**	**Estadounidense**
2.THANOS,	**Christopher**	**Estadounidense**

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

DIRECCIÓN	CIUDAD	ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
1. 555 48th Avenue	**San Francisco,**	**California 94121,**	**Estados Unidos de América**
2. 3579 Sacramento Street	**San Francisco,**	**California 94118,**	**Estados Unidos de América**

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 ☐ **REPRESENTANTE LEGAL** ☒ **APODERADO**

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
RODRIGUEZ D'ALEMAN	**DILIA MARIA**	**C.C.41.654.882 T.P.20824 CSJ**

DIRECCIÓN	**Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6**	No. TELÉFONO	**6181088**
CIUDAD	**Bogotá, D.C.**		
PAÍS	**Colombia**	CORREO ELECTRÓNICO	**clarkemodet@clarkemodet.com.co**

10 DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA AAA/MM/DD
Estados Unidos de América	US	61/124.021	2008/04/11

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13	REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas	☐
Universidades públicas o privadas	☐
Entidades sin ánimo de lucro	☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-023068 // 13-040118	Fecha 07/03/2013 29/04/2013

16	FIRMA DEL APODERADO :

DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN
C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ

17	ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 449
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 33
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 3
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☐ Poderes, si fuera el caso.
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medinas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR VII QUE SE MODIFICAN Y USOS DE LOS MISMOS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan proteínas terapéuticas modificadas. En particular se proporcionan polipéptidos modificados del Factor VII, el cual incluye el Factor VIIa y otras formas del Factor VII, y usos de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La hemostasis es el proceso fisiológico complejo que conduce a la suspensión del sangrado. Las plaquetas, proteínas del plasma y los vasos sanguíneos y células endoteliales son los tres componentes de este proceso, en que cada uno juega un papel importante en los eventos que siguen inmediatamente a la lesión de tejidos y el cual, bajo circunstancias normales, resulta en la formación rápida de un coágulo. La cascada de coagulación es medular para esto, una serie de eventos proteolíticos en los cuales determinadas proteínas de plasma (o factores de coagulación) se activan secuencialmente en una "cascada" por otro factor de coagulación previamente activado, conduciendo a una generación rápida de la trombina. Las grandes cantidades de trombina producidas en esta cascada luego funcionan para escindir el fibrinógeno en péptidos de fibrina que se requieren para la formación de coágulos.

Los factores de coagulación circulan como zimógenos inactivos de cadena sencilla, I se activan por escisión en una o más posiciones para generar una forma activada de dos cadenas

200000

de la proteína. El factor VII (FVII), una proteína del plasma dependiente de la vitamina K, circula inicialmente en la sangre como un zimógeno. El zimógeno FVII se activa por la escisión proteolítica en un sitio sencillo, Arg^{152}-Ile^{153}, lo que resulta en una proteasa de dos cadenas ligada por un enlace sencillo bisulfuro (FVIIa). El FVIIa se enlaza a su cofactor, factor de tejido (TF), para formar un complejo en el cual FVIIa puede activar efectivamente el factor X (FX) al FXa, con lo que se inicia la serie de eventos que resultan en la formación de fibrina y la hemostasis. Aunque la hemostasis normal se alcanza en la mayoría de los casos, los defectos en el proceso pueden conducir a trastornos de sangrado en los cuales se prolonga el tiempo que se toma para la formación del coágulo. Tales trastornos pueden ser congénitos o adquiridos. Por ejemplo, las hemofilias A y B son enfermedades heredadas caracterizadas por deficiencias en el factor VIII (FVIII) y el factor IX (FIX), respectivamente. La terapia de reemplazo es el tratamiento tradicional para las hemofilias A y B, e involucra la administración intravenosa de FVIII o FIX, ya sea preparados a partir de plasma humano o como proteínas recombinantes. En muchos casos, sin embargo, los pacientes desarrollan anticuerpos (también conocidos como inhibidores) contra las proteínas de infusión, lo cual reduce o niega la eficiencia del tratamiento. El FVIIa recombinante (Novoseven® (Factor de Coagulación VIIa (Recombinante))) ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con hemofilia A o B que tienen inhibidores para FVIII o FIX, y se puede usar también para detener episodios de sangrado o evitar el sangrado asociado con

33

el trauma y/o cirugía. El FVIIa recombinante también ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con deficiencia congénita FVII, y se utiliza crecientemente en usos fuera de aprobación, tales como el tratamiento del sangrado asociado con otros trastornos de sangrado congénitos o adquiridos, trauma, y cirugía en pacientes no hemofílicos. El uso del FVIIa recombinante para promover la formación de coágulos soporta su importancia creciente como un agente terapéutico. La terapia con FVIIa deja una necesidad médica importante no atendida. Por ejemplo, con base en los datos de ensayos clínicos, un promedio de 3 dosis de FVIIa durante un periodo de tiempo de 6 o más horas se requiere para manejar episodios agudos de sangrado en pacientes con hemofilia. Se necesitan variantes más eficaces de FVIIa para reducir estos requerimientos. Por lo tanto, entre los objetivos en la presente, es un objetivo proporcionar polipéptidos FVII modificados que se diseñen para tener propiedades terapéuticas mejoradas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan en la presente polipéptidos modificados del Factor VII (FVII). En particular, se proporcionan en la presente polipéptidos FVII modificados que muestran actividades procoagulantes. Los polipéptidos FVII se modifican en la secuencia primaria en comparación con un polipéptido FVII no modificado, y pueden incluir inserciones, eliminaciones y reemplazos de aminoácidos. Los polipéptidos FVII modificados aquí proporcionados incluyen polipéptidos FVII que muestran aquellos que tienen resistencia incrementada a inhibidores

tales como antitrombina III (AT-III) e inhibidor de la trayectoria del factor de tejido (TFPI), aquellos que tienen resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+}, aquellos que tienen actividad catalítica incrementada en la presencia y/o ausencia de TF, aquellos que tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media creciente, aquellos que tienen enlace y/o afinidad incrementada para la albúmina de suero, y aquellos que tienen enlace y/o afinidad para la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$. Los polipéptidos FVII modificados pueden contener cualquier combinación de modificaciones aquí proporcionados, por lo que una o más actividades o propiedades del polipéptido se alteran en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Típicamente el polipéptido FVII modificado retiene proactividad coagulante. También se proporcionan en la presente moléculas de ácidos nucleicos, vectores y células que codifican/expresan polipéptidos FVII modificados. Composiciones farmacéuticas, artículos de manufactura, kits y métodos de tratamiento también son aquí proporcionados. Los polipéptidos FVII incluyen variantes de especies y alélicas y polipéptidos y otras variantes que tienen modificaciones que afectan otras actividades y/o propiedades. También se incluyen fragmentos activos de los polipéptidos FVII que incluyen una modificación aquí proporcionada. Ejemplos de los polipéptidos FVII son aquellos que incluyen la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3, así como variantes de la misma que tienen 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con ella.

35

Se proporcionan en la presente polipéptidos modificados por el factor VII (FVII) que contienen una modificación en un polipéptido FVII en la posición Q286 en un polipéptido FVII que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3 o en los residuos correspondientes en un polipéptido FVII. La modificación puede ser un reemplazo de aminoácidos, inserción(es) o eliminación(es) de aminoácidos, o combinación de los mismos. En casos en donde la modificación es un reemplazo de aminoácidos, el reemplazo se puede hacer por un aminoácido básico (por ejemplo Arg (R), Lys (K) y His (H)) o un aminoácido seleccionado de entre Arg (R), Lys (K) His (H), Tyr (Y), Gly (G), Phe (F), Met (M), He (I), Leu (L), Val (V), Pro (P), Glu (E), Trp (W), Asp (D), y Cys (C). Ejemplos de tales reemplazos de aminoácidos incluyen Q286R, Q286K, Q286H, Q286Y, Q286G, Q286F, Q286M, Q286I, Q286L, Q286V, Q286P, Q286E, Q286W, Q286D, y Q286C. Tales modificaciones se pueden hacer en un polipéptido FVII no modificado que contiene una secuencia establecida en cualesquiera de SEQ ID NOS: 1-3, o una variante alélica o de especie de la misma, o una variante que tiene al menos 60% de identidad de secuencias con el FVII de cualesquiera de SEQ ID NOS: 1-3, o un fragmento activo de un polipéptido FVII que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 1-3, o una variante alélica o de especie de la misma, o una variante que tiene al menos 60% de identidad de secuencias with el FVII de cualesquiera de SEQ ID NOS: 1-3. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede ser un fragmento activo que contiene reemplazo en una posición que corresponde a la posición Q286 en

un polipéptido FVII.

En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados proporcionados en la presente contienen un reemplazo de aminoácidos en una posición que corresponde a la posición 286 en un polipéptido FVII que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3 o en un residuo correspondiente en un polipéptido FVII, en donde la modificación es reemplazo en la posición 286 por un aminoácido básico que resulta en un polipéptido FVII modificado que muestra actividad coagulante aumentada en comparación con el polipéptido FVII que no tiene la modificación en la posición 286. El aminoácido básico puede ser seleccionado de entre Arg (R), Lys (K) y His (H). Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado aquí proporcionado puede contener un reemplazo de Gln (Q) con Arg (R) en la posición 286.

En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados tienen solamente la modificación sencilla en la posición 286. En otros ejemplos, los polipéptidos FVII modificados también contienen una o más modificaciones adicionales en otra posición en el polipéptido FVII. La modificación adicional puede ser un reemplazo, inserción o eliminación de aminoácidos. Por ejemplo, la modificación adicional puede ser un reemplazo de aminoácidos en una posición que corresponde a una posición seleccionada de entre A51, S52, P54, S60, Q66, Y68, K109, S119, A122, G124, T130, E132, V158, K161, A175, D196, K197, K199, R202, H216, S222, G237, T239, H257, Q286, L287, R290 A292, A294, E296, M298, L305, S314, G318, P321, K337, K341, Q366, H373, F374, E394, P395 y R396. Ejemplos de tales modificaciones incluyen

37

D196K, D196R, D196A, D196Y, D196F, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, R290M, R290V, K341E, K341R, K341Q, K341N, K341M, K341D, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA, K197I198insS, T239S, T239N, T239Q, T239V, T239L, T239H, T239I, L287T, M298Q, P321K, P321E, P321Y, P321S, Q366D, Q366E, Q366N, Q366T, Q366S, Q366V, Q366I, Q366L, Q366M, H373D, H373E, H373S, H373L, H373I, H373F, H373A, K161S, K161A, K161V, H216S, H216A, H216K, H216R, S222A, S222K, S222V, S222N, S222E, S222D, H257A, H257S, Gla Intercambio FIX, {Gla Intercambio FIX/E40L}, {Gla Intercambio FIX/K43I}, {Gla Intercambio FIX/Q44S}, {Gla Intercambio FIX/MI 9K}, {Gla Intercambio FIX/M19K/E40L/K43I/Q44S}, Gla Intercambio FX, Gla Intercambio Prot C, Gla Intercambio Prot S, Gla Intercambio Trombina, S52A, S60A, E394N, P395A, R396S, R202S, A292N, A294S, G318N, A175S, K109N, A122N, G124S, A51N, T130N, E132S, S52N, P54S, S119N, L121S, T128N, P129A, Q66N, Y68S, S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE, H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE, T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE, S103S111delinsDICLPRWGCLWED, H115S126delinsDICLPRWGCLWED, T128P134delinsDICLPRWGCLWED, P406insIEDICLPRWGCLW, P406insGGGSIEDICLPRWGCLW,

38

P406insDICLPRWGCLWED, P406insGGGSDICLPRWGCLWED, S103S111delinsSFGRGDIRNV, H115S126delinsSFGRGDIRNV, T127P134delinsSFGRGDIRNV, P406insCSFGRGDIRNVC, P406insGGGSCSFGRGDIRNVC, V158T, V158D, L287T, E296V, M298K y M298Q.

Ejemplos de los polipéptidos FVII modificados que se proporcionan en la presente son aquellos que contienen modificaciones Q286R/M298Q, Q286R/Gla Intercambio FIX, Q286R/H257A, Q286R/S222A, Q286R/S222A/H257A, Q286R/S222A/Gla Intercambio FIX, Q286R/H257A/Gla Intercambio FIX, Q286R/S222A/H257A/Gla Intercambio FIX, Q286R/M298Q/K341Q, Q286R/M298Q/K199E, Q286R/M298Q/Gla Intercambio FIX, Q286R/Q366V, Q286R/A292N/A294S/Q366V, A175S/Q286R/Q366V, S222A/Q286R/Q366V, H257S/Q286R, H257S/Q286R/Q366V, S222A/H257A/Q286R/Q366V, Q286R/H373A, S222A/H257A/Q286R/M158Q, Q286R/K341D, Q286R/Q366D, Q286R/Q366N, Q286R/M298Q/Q366D, Q286R/M298Q/Q366N, Q286R/H373F, Q286R/M298Q/H373F, {Gla Intercambio FIX/E40L}/Q286R/M298Q, {Gla Intercambio FIX/K43I}/Q286R/M298Q, {Gla Intercambio FIX/Q44S}/Q286R/M298Q, {Gla Intercambio FIX/M19K}/Q286R/M298Q, {Gla Intercambio FIX/M19K/E40L/K43I/Q44S}/Q286R/M298Q, T128N/P129A/Q286R, T128N/P129A/Q286R/M298Q, T128N/P129A/Q286R/H373F, V158D/Q286R/E296V/M298Q, Gla Intercambio FIX/T128N/P129A/S222A/Q286R, Gla Intercambio FIX/T128N/P129A/Q286R/M298Q, T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/M298Q, T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F, S52A/S60A/Q286R, Gla Intercambio FIX/S52A/S60A/S222A/Q286R, S52A/S60A/Q286R/M298Q, Gla

000009

Intercambio FIX/S52A/S60A/Q286R/M298Q, S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M298Q, S52A/S60A/Q286R/H373F/, S52A/S60A/Q286R/M298Q/H373F, T239V/Q286R, Gla Intercambio FIX/S222A/T239V/Q286R, T239V/Q286R/M298Q, S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q, Gla Intercambio FIX/T239V/Q286R/M298Q, T239V/Q286R/H373F, T239V/Q286R/M298Q/H373F, T239I/Q286R, Gla Intercambio FIX/S222A/T239I/Q286R, T239I/Q286R/M298Q, S222A/T239I/H257A/Q286R/M298Q, Gla Intercambio FIX/T239I/Q286R/M298Q, T239I/Q286R/H373F, T239I/Q286R/M298Q/H373F, Gla Intercambio FIX/S222A/Q286R/H373F, Gla Intercambio FIX/S222A/Q286R/M298Q, Gla Intercambio FIX/S222A/Q286R/M298Q/H373F, V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F, H257A/Q286R/M298Q, H257S/Q286R/M298Q, Gla Intercambio FIX/S222A/H257S/Q286R/, S222A/H257S/Q286R/M298Q, H257S/Q286R/M298Q/H373F, S222A/Q286R/M298Q/H373F, S222A/Q286R/M298Q, T128N/P129A/A175S/Q286R, A122N/G124S/A175S/Q286R, Gla Intercambio FIX/T128N/P129A/A175S/S222A/Q286R, Gla Intercambio FIX/A122N/G124S/A175S/S222A/Q286R, T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q, A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q, T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q, A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q, T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q/H373F, A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F, {Gla Intercambio FIX /K43I}/T128N/P129A/Q286R/M298Q, T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N, {Gla Intercambio FIX/K43I}/Q286R/M298Q/Q366N, {Gla Intercambio FIX /K43I}/ T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N,

40

V158D/Q286R/E296V/M298Q,
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F, T239V/Q286R/M298Q/Q366N,
T239I/Q286R/M298Q/Q366N, T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q,
T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q,
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q/H373F,
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q o
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q/H373F.

Se proporcionan en la presente polipéptidos FVII modificados que contienen dos o más modificaciones en un polipéptido FVII, variante alélica o de especie de la misma o fragmentos activos del mismo. Al menos una de las modificaciones en tales polipéptidos está en una posición que corresponde a la posición Q286 en un polipéptido FVII que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3 o en los residuos correspondientes en un polipéptido FVII, con la condición de que la modificación en la posición Q286, sola o en combinación con alguna otra modificación, no resulta en la introducción de un nuevo sitio de glicosilación comparado con el polipéptido FVII no modificado. Tales modificaciones puede ser un reemplazo, inserción o eliminación de aminoácidos. Por ejemplo, la modificación en la posición Q286 puede ser un reemplazo por un aminoácido seleccionado de entre Arg (R), Lys (K) His (H), Tyr (Y), Gly (G), Phe (F), Met (M), Ile (I), Leu (L), Val (V), Pro (P), Glu (E), Trp (W), Asp (D), y Cys (C). En algunos ejemplos, la modificación es Q286R. La una o más de otras modificaciones se puede seleccionar de entre D196K, D196R, D196A, D196Y, D196F, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A,

41

K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, R290M, R290V, K341E, K341R, K341Q, K341N, K341M, K341D, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA, K197I198insS, T239S, T239N, T239Q, T239V, T239L, T239H, T239I, L287T, P321K, P321E, P321Y, P321S, Q366D, Q366E, Q366N, Q366T, Q366S, Q366V, Q366I, Q366L, Q366M, H373D, H373E, H373S, H373F, H373A, K161S, K161A, K161V, H216S, H216A, H216K, H216R, S222A, S222K, S222V, S222N, S222E, S222D, H257A, H257S, Gla Intercambio FDC , {Gla Intercambio FDC/E40L}, {Gla Intercambio FIX/K43I}, {Gla Intercambio FIX/Q44S}, {Gla Intercambio FIX/M19K}, {Gla Intercambio FDC/M19K/E40L/K43I/Q44S}, Gla Intercambio FX, Gla Intercambio Prot C, Gla Intercambio Prot S, Gla Intercambio Trombina, S52A, S60A, E394N, P395A, R396S, R202S, A292N, A294S, G318N, A175S, K109N, A122N, G124S, A51N, T130N, E132S, S52N, P54S, S119N, L121S, T128N, P129A, Q66N, Y68S, S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE, H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE, T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE, S103S111delinsDICLPRWGCLWED, H115S126delinsDICLPRWGCLWED, T128P134delinsDICLPRWGCLWED, P406insIEDICLPRWGCLW, P406insGGGSIEDICLPRWGCLW, P406insDICLPRWGCLWED, P406insGGGSDICLPRWGCLWED, S103S111delinsSFGRGDIRNV, H115S126delinsSFGRGDIRNV, T127P134delinsSFGRGDIRNV, P406insCSFGRGDIRNVC,

42

P406insGGGSCSFGRGDIRNVC, V158T, V158D, L287T, E296V, M298K y M298Q.

En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados contienen una modificación en una posición correspondiente P54, Q66, L121, A122, P129 o E132 en un polipéptido FVII que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3 o en los residuos correspondientes en un polipéptido FVII. Modificaciones ejemplares incluyen P54S, Q66N, L121S, A122N, P129A y E132S. En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados que contienen una modificación en una posición correspondiente P54, Q66, L121, A122, P129 o E132 también contienen una o más modificaciones adicionales, incluyendo reemplazos, inserciones o eliminaciones de aminoácidos en otra posición en el polipéptido FVII. Tales modificaciones incluyen P54S, S52N, Y58S, S119N, G124S, T128N, T130N, V158D, A175S, S222A, G241S, E296V, M298Q, E394N, P395A, R396S, G318N y Q366V. Así, ejemplos de las modificaciones de combinación en un polipéptido FVII que se proporcionan en la presente son S119N/L121S, T128N/P129A, A122N/G124S, A122N/G124S/A175S, A122N/G124S/E394N/P395A/R396S, A122N/G124S/E394N/P395A/R396S/G318N, A122N/G124S/E394N/P395A/R396S, S52N/P54S/A122N/G124S/E394N/P395A/R396S, S52N/P54S, S119N/L121S/A175S, T128N/P129A/A175S, T130N/E132S, Q66N/Y68S, T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q, T128N/P129A/S222A, T128N/P129A/A175S/Q366V, A122N/G124S/A175S/Q366V, T128N/P129A/A175S/S222A, A122N/G124S/A175S/S222A, T128N/P129A/M298Q y T128N/P129A/M298Q/H373F.

43

También se proporcionan en la presente polipéptidos FVII modificados que contienen una modificación que corresponde a T239S, T239Q, T239V, T239L, T239H, T239I, P321K, P321E, P321Y, P321S, Q366D, Q366N, Q366V, Q366I, Q366L, Q366M, H373D, H373E, H373S, H373F, H373A, K161S, K161V, H216S, H216K, H216R, S222A, S222K, S222V, S222D, S222N, S222E o H257S en un polipéptido FVII que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3 o en los residuos correspondientes en un polipéptido FVII. Además, tales polipéptidos FVII modificados también pueden contener una o más modificaciones adicionales en otra posición, tal como la posición de aminoácidos A51, S52, P54, S60, Q66, Y68, K109, S119, A122, G124, T130, E132, V158, K161, A175, D196, K197, K199, R202, H216, S222, G237, T239, H257, Q286, L287, R290 A292, A294, E296, M298, L305, S314, G318, P321, K337, K341, Q366, H373, F374, E394, P395 y R396. Modificaciones ejemplares en estas posiciones incluyen Q286N, Q286E, Q286D, Q286S, Q286T, Q286R, Q286K, Q286A, Q286V, Q286M, Q286L, Q286Y, D196K, D196R, D196A, D196Y, D196F, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, R290M, R290V, K341E, K341R, K341Q, K341N, K341M, K341D, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K1971198insE, K1971198insY, K1971198insA, K1971198insS, T239S, T239N, T239Q, T239V, T239L, T239H, T239I, L287T, P321K, P321E, P321Y, P321S, Q366D, Q366E, Q366N, Q366T, Q366S, Q366V, Q366I, Q366L, Q366M, H373D, H373E,

H373S, H373F, H373A, K161S, K161A, K161V, H216S, H216A, H216K, H216R, S222A, S222K, S222V, S222N, S222E, S222D, H257A, H257S, Gla Intercambio FIX, Gla Intercambio FX, Gla Intercambio Prot C, Gla Intercambio Prot S, Gla Intercambio Trombina, Gla Intercambio FIX , {Gla Intercambio FIX/E40L}, {Gla Intercambio FIX/K431}, {Gla Intercambio FIX/Q44S}, {Gla Intercambio FIX/M19K}, {Gla Intercambio FIX/M19K/E40L/K43I/Q44S}, S52A, S60A, E394N, P395A, R396S, R202S, A292N, A294S, G318N, A175S, K109N, A122N, G124S, A51N, T130N, E132S, S52N, P54S, S1 19N, L121S, T128N, P129A, Q66N, Y68S, S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE, H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE, T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE, S103S111delinsDICLPRWGCLWED, H115S126delinsDICLPRWGCLWED, T128P134delinsDICLPRWGCLWED, P406insIEDICLPRWGCLW, P406insGGGSIEDICLPRWGCLW, P406insDICLPRWGCLWED, P406insGGGSDICLPRWGCLWED, S103S111delinsSFGRGDIRNV, H115S126delinsSFGRGDIRNV, T127P134delinsSFGRGDIRNV, P406insCSFGRGDIRNVC, P406insGGGSCSFGRGDIRNVC, V158T, V158D, L287T, M298K y M298Q. Las modificaciones de combinación resultantes pueden incluir Q366D/H373E, Q366V/H373V, Q366V/H373L, Q366V/H373I, S222K/H257A, H216A/S222A, S222S/Gla Intercambio FIX, S222A/H257A/Gla Intercambio FIX, S222A/M298Q, S222A/H257A/M298Q, S222A/A292N/A294S/Q366V, A175S/S222A/Q366V, S222A/Q366V, H257S/Q366V, S222A/H373A, M298Q/H373F, S52A/S60A/S222A, S222A/T239V, V158D/T239V/E296V/M298Q,

JG

S222A/T239I, V158D/E296V/M298Q/H373F, Gla Intercambio FIX/Q366V, M298Q/Q366N/H373F, T239V/M298Q/H373F y T239I/M298Q/H373F.

Se proporcionan en la presente polipéptidos FVII modificados que contienen dos o más modificaciones en un polipéptido FVII, variante de especies y alélicas del mismo o fragmentos activos del mismo, en donde las dos o más modificaciones de aminoácidos son seleccionadas de entre modificaciones de aminoácidos que corresponden a H216A, H257A, E394N, P395A, R396S, K109N, A292N, A175S, H257A y Gla Intercambio FIX. Por ejemplo, polipéptidos FVII modificados aquí proporcionados incluyen aquellas con modificaciones seleccionadas de entre H216A/H257A, E394N/P395A/R396S y K109N/A175S. Además, también se puede incluir una modificación que corresponde a M298Q o A294S. Así, también se proporcionan en la presente polipéptidos FVII modificados que contienen modificaciones seleccionadas de entre H216A/H257A, E394N/P395A/R396S y K109N/A175S. En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados también contienen una modificación que corresponde a M298Q o A294S. Esto puede resultar en, por ejemplo, un polipéptido FVII modificado que contiene las modificaciones H257A/M298Q o K109N/A292N/A294S. También se proporcionan polipéptidos FVII modificados que contienen modificaciones que corresponden a S52A/S60A/V158D/E296V/M298Q o V158D/T239I/E296V/M298.

En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados aquí suministrados contienen una secuencia de enlace a la albúmina de suero, tal como una secuencia de aminoácidos

46

establecida en cualesquiera de SEQ ID NOS: 103-109, o una porción suficiente de las mismas para efectuar el enlace a albúmina de suero. Tales polipéptidos FVII modificados pueden mostrar afinidad incrementada para o enlace a albúmina de suero en comparación con el polipéptido FVII no modificado. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados que contienen una secuencia de enlace a la albúmina de suero pueden mostrar al menos alrededor de o 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más afinidad incrementada para o enlace a enlace para albúmina de suero. La secuencia de enlace a la albúmina de suero puede reemplazar una secuencia contigua de residuos de aminoácidos del polipéptido FVII no modificado. Polipéptidos FVII modificados que contienen una secuencia de enlace a la albúmina de suero pueden contener una modificación seleccionada de entre S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF, S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE, H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE, T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE, S103S111delinsDICLPRWGCLWED, H115S126delinsDICLPRWGCLWED, T128P134delinsDICLPRWGCLWED, P406insIEDICLPRWGCLW, P406insGGGSIEDICLPRWGCLW, P406insDICLPRWGCLWED y P406insGGGSDICLPRWGCLWED

Se proporcionan en la presente polipéptidos FVII modificados que contienen una secuencia de enlace a integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$. Tales polipéptidos FVII modificados pueden mostrar afinidad incrementada para o enlace a la integrina de

47

plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ en comparación con el polipéptido FVII no modificado. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados que contienen una secuencia de enlace de integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ pueden mostrar al menos alrededor de o 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más afinidad incrementada para o enlace a la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ en comparación con el polipéptido FVII no modificado. Ejemplos de secuencia de enlace a la albúmina de suero incluyen aquellas secuencias de aminoácidos establecidas en cualesquiera de SEQ ID NOS: 110-112, o una porción suficiente de las mismas para efectuar el enlace a la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$, lo cual puede reemplazar una secuencia contigua de residuos de aminoácidos del polipéptido FVII no modificado. Polipéptidos FVII modificados que contienen una modificación seleccionados de entre S103S111delinsSFGRGDIRNV, H115S126delinsSFGRGDIRNV, T127P134delinsSFGRGDIRNV, P406insCSFGRGDIRNVC y P406insGGGSCSFGRGDIRNVC.

Los polipéptidos FVII modificados que contienen una secuencia de enlace a albúmina de suero o integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ también pueden contener una o más modificaciones adicionales en otra posición en el polipéptido FVII, tal como reemplazo de aminoácidos en una posición que corresponde a la posición G237V. Así también se proporcionan en la presente polipéptidos FVII modificados que contienen una modificación seleccionados de entre S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V,

S103S111delinsDICLPRWGCLWED/G237V,

H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V,

H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V,

H115S126delinsDICLPRWGCLWED/G237V,

T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V,

T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V,

S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V y

T128P134delinsDICLPRWGCLWED/G237V

En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados aquí proporcionados contienen 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más modificaciones. En ejemplos adicionales, los polipéptidos FVII modificados aquí suministrados contienen un dominio heterólogo Gla, o una porción suficiente de los mismos para efectuar el enlace a fosfolípidos. Tales polipéptidos pueden mostrar afinidad incrementada para o enlace a fosfolípidos en comparación con el polipéptido FVII no modificado, tal como al menos alrededor de o 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más afinidad o enlace creciente para fosfolípidos. El dominio heterólogo Gla puede ser seleccionado de entre un dominio Gla en Factor IX (FIX), Factor X (FX), protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína de matriz Gla, proteína 6 específica de suspensión del crecimiento (Gas6) y proteína Z y, en algunos ejemplos, puede tener una secuencia de aminoácidos establecida en cualesquiera de SEQ ID NOS: 83-91, 93 y 94, o una porción suficiente de las mismas para efectuar el enlace a fosfolípidos. Todo o una porción contigua del dominio nativo

49

FVII de Gla, que puede incluir aminoácidos 1-45 en un polipéptido FVII que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3, o en los residuos correspondientes en un polipéptido FVII, se puede remover y reemplazar con el dominio heterólogo Gla, o una porción suficiente del mismo para efectuar el enlace a fosfolípidos.

Polipéptidos FVII modificados aquí proporcionados pueden mostrar resistencia incrementada a antitrombina III en comparación con el polipéptido FVII no modificado. Tal polipéptido FVII modificado puede mostrar al menos o alrededor de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más resistancia a antitrombina III en comparación con el polipéptido FVII no modificado. Los polipéptidos FVII modificados aquí proporcionados también pueden mostrar actividad coagulante o catalítica creciente en comparación con el polipéptido FVII no modificado, tal como un incremento de al menos alrededor de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Además, los polipéptidos FVII modificados aquí proporcionados pueden mostrar resistencia incrementada a TFPI en comparación con el polipéptido FVII no modificado. Tales polipéptidos FVII modificados puede ser al menos o alrededor de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más

50

resistentes a TFPI en comparación a un polipéptido FVII no modificado. Los polipéptidos FVII modificados aquí proporcionados también pueden mostrar resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+} en comparación con el polipéptido FVII no modificado. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede ser al menos o alrededor de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más resistente a los efectos inhibidores de Zn^{2+} en comparación con polipéptido FVII no modificado.

En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados aquí proporcionados contienen una o más modificaciones que introducen y/o eliminan uno o más sitios de glicosilación en comparación con el polipéptido FVII no modificado. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más sitios de glicosilación pueden ser introducidos o eliminados. Los sitios de glicosilación que pueden ser introducidos o eliminados incluyen sitios de N-glicosilación y sitios de O-glicosilación. Los polipéptidos FVII modificados aquí proporcionados pueden contener una o más modificaciones adicionales de aminoácidos que incrementen la resistencia a antitrombina-III, incrementen el enlace y/o afinidad a fosfolípidos, incrementen la afinidad para el factor de tejido, incrementen la actividad intrínseca, incrementen la actividad dependiente de TF, incrementen la actividad coagulante, alteren la conformación del polipéptido para alterar la zimogenicidad, incrementen la actividad coagulante o catalítica al cambiar el equilibrio entre conformaciones altamente activas y menos activas de FVIIa a favor de las

51

conformaciones altamente activas, incremente la resistencia a las proteasas, disminuyan la glicosilación, incrementen la glicosilación, reduzcan la inmunogenicidad, incrementen la estabilidad, y/o faciliten la ligadura de grupos químicos. En algunos ejemplos, la zimogenicidad alterada confiere una forma más del tipo zimógeno o una forma menos del tipo zimógeno.

En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados aquí proporcionados contienen una o más modificaciones adicionales de aminoácidos seleccionadas de entre S279C/V302C, L280C/N301C, V281C/V302C, S282C/V299C, inserción de una tirosina en la posición 4, F4S, F4T, P10Q, P10E, P10D, P10N, Q21N, R28F, R28E, I30C, I30D, I30E, K32D, K32Q, K32E, K32G, K32H, K32T, K32C, K32A, K32S, D33C, D33F, D33E, D33K, A34C, A34E, A34D, A34I, A34L, A34M, A34V, A34F, A34W, A34Y, R36D, R36E, T37C, T37D, T37E, K38C, K38E, K38T, K38D, K38L, K38G, K38A, K38S, K38N, K38H, L39E, L39Q, L39H, W41N, W41C, W41E, W41D, I42R, I42N, I42S, I42A, I42Q, I42N, I42S, I42A, I42Q, I42K, S43Q, S43N, Y44K, Y44C, Y44D, Y44E, S45C, S45D, S45E, D46C, A51N, S53N, G58N, G59S, G59T, K62E, K62R, K62D, K62N, K62Q, K62T, L65Q, L65S, L65N, F71D, F71Y, F71E, F71Q, F71N, P74S, P74A, A75E, A75D, E77A, E82Q, E82N, E82S, E82T T83K, N95S, N95T, G97S, G97T, Y101N, D104N, T106N, K109N, E116D, G117N, G124N, S126N, T128N, L141C, L141D, L141E, E142D, E142C, K143C, K143D, K143E, R144E, R144C, R144D, N145Y, N145G, N145F, N145M, N145S, N145I, N145L, N145T, N145V, N145P, N145K, N145H, N145Q, N145E, N145R, N145W, N145D, N145C, K157V, K157L, K157I, K157M, K157F, K157W, K157P, K157G, K157S, K157T, K157C, K157Y, K157N, K157E, K157R, K157H, K157D, K157Q, V158L, V158I, V158M,

52

V158F, V158W, V158P, V158G, V158S, V158T, V158C, V158Y, V158N, V158E, V158R, V158K, V158H, V158D, V158Q, A175S, A175T, G179N, 1186S, 1186T, V188N, R202S, R202T, I205S, I205T, D212N, E220N, I230N, P231N, P236N, G237N, Q250C, V253N, E265N, T267N, E270N, A274M, A274L, A274K, A274R, A274D, A274V, A274I, A274F, A274W, A274P, A274G, A274T, A274C, A274Y, A274N, A274E, A274H, A274S, A274Q, F275H, R277N, F278S, F278A. F278N, F278Q, F278G, L280N, L288K, L288C, L288D, D289C, D289K, L288E, R290C, R290G, R290A, R290S, R290T, R290K, R290D, R290E, G291E, G291D, G291C, G291N, G291K, A292C, A292K, A292D, A292E, T293K, E296V, E296L, E296I, E296M, E296F, E296W, E296P, E296G, E296S, E296T, E296C, E296Y, E296N, E296K, E296R, E296H, E296D, E296Q, M298Q, M298V, M298L, M298I, M298F, M298W, M298P, M298G, M298S, M298T, M298C, M298Y, M298N, M298K, M298R, M298H, M298E, M298D, P303S, P303T, R304Y, R304F, R304L, R304M, R304G, R304T, R304A, R304S, R304N, L305V, L305Y, L305I, L305F, L305A, L305M, L305W, L305P, L305G, L305S, L305T, L305C, L305N, L305E, L305K, L305R, L3O5H, L305D, L305Q, M306D, M306N, D309S, D309T, Q312N, Q313K, Q313D, Q313E, S314A, S314V, S314I, S314M, S314F, S314W, S314P, S314G, S314L, S314T, S314C, S314Y, S314N, S314E, S314K, S314R, S314H, S314D, S314Q, R315K, R315G, R315A, R315S, R315T, R315Q, R315C, R315D, R315E, K316D, K316C, K316E, V317C, V317K, V317D, V317E, G318N, N322Y, N322G, N322F, N322M, N322S, N322I, N322L, N322T, N322V, N322P, N322K, N322H, N322Q, N322E, N322R, N322W, N322C, G331N, Y332S, Y332A, Y332N, Y332Q, Y332G, D334G, D334E, D334A, D334V, D334I, D334M, D334F, D334W, D334P, D334L, D334T, D334C, D334Y, D334N, D334K, D334R, D334H, D334S, D334Q, S336G, S336E, S336A, S336V, S336I, S336M, S336F, S336W, S336P, S336L, S336T, S336C, S336Y,

53

S336N, S336K, S336R, S336H, S336D, S336Q, K337L, K337V, K337I, K337M, K337F, K337W, K337P, K337G, K337S, K337T, K337C, K337Y, K337N, K337E, K337R, K337H, K337D, K337Q, K341E, K341Q, K341G, K341T, K341A, K341S, G342N, H348N, R353N, Y357N, I361N, F374P, F374A, F374V, F374I, F374L, F374M, F374W, F374G, F374S, F374T, F374C, F374Y, F374N, F374E, F374K, F374R, F374H, F374D, F374Q, V376N, R379N, L390C, L390K, L390D, L390E, M391D, M391C, M391K, M391N, M391E, R392C, R392D, R392E, S393D, S393C, S393K, S393E, E394K, P395K, E394C, P395D, P395C, P395E, R396K, R396C, R396D, R396E, P397D, P397K, P397C, P397E, G398K, G398C, G398D, G398E, V399C, V399D, V399K, V399E, L400K, L401K, L401C, L401D, L401E, R402D, R402C, R402K, R402E, A403K, A403C, A403D, A403E, P404E, P404D, P404C, P404K, F405K, P406C, K32N/A34S, K32N/A34T, F31N/D33S, F31N/D33T, I30N/K32S, I30N/K32T, A34N/R36S, A34N/R36T, K38N/F40S, K38N/F40T, T37N/L39S, T37N/L39T, R36N/K38S, R36N/K38T, L39N/W41S, L39N/W41T, F40N/I42S, F40N/I42T, I42N/Y44S, I42N/Y44T, Y44N/D46S, Y44N/D46T, D46N/D48S, D46N/D48T, G47N/Q49S, G47N/Q49T, K143N/N145S, K143N/N145T, E142N/R144S, E142N/R144T, L141N/K143S, L141N/K143T, I140N/E142S, I140N/E142T, R144N/A146S, R144N/A146T, A146N/K148S, A146N/K148T, S147N/P149S/, S147N/P149T, R290N/A292S, R290N/A292T, D289N/G291S, D289N/G291T, L288N/R290S, L288N/R290T, L287N/D289S, L287N/D289T, A292N/A294S, A292N/A294T, T293N/L295S, T293N/L295T, R315N/V317S, R315N/V317T, S314N/K316S, S314N/K316T, Q313N/R315S, Q313N/R315T, K316N/G318S, K316N/G318T, V317N/D319S, V317N/D319T, K341N/D343S, K341N/D343T, S339N/K341S, S339N/K341T, D343N/G345S,

54

D343N/G345T, R392N/E394S, R392N/E394T, L390N/R392S, L390N/R392T, K389N/M391S, K389N/M391T, S393N/P395S, S393N/P395T, E394N/R396S, E394N/R396T, P395N/P397S, P395N/P397T, R396N/G398S, R396N/G398T, P397N/V399S, P397N/V399T, G398N/L400S, G398N/L400T, V399N/L401S, V399N/L401T, L400N/R402S, L400N/R402T, L401N/A403S, L401N/A403T, R402N/P404S, R402N/P404T, A403N/F405S, A403N/F405T, P404N/P406S y P404N/P406T. En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados también contienen una sustitución de las posiciones 300-322, 305-322, 300-312, o 305-312 con los aminoácidos correspondientes de tripsina, trombina o FX, o sustitución de las posiciones 310-329, 311-322 o 233-329 con los aminoácidos correspondientes de tripsina.

Ejemplos de polipéptidos FVII modificados que se proporcionan en la presente son aquellos que tienen una secuencia de aminoácidos establecida en cualesquiera de SEQ ID NOS: 113-273. En algunos ejemplos, las modificaciones se hacen en un polipéptido FVII no modificado que es una variante alélica o de especies del polipéptido establecido en SEQ ID NO:3. La variante alélica o de especies u otra variante puede tener 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% identidad de secuencias con el polipéptido establecido en SEQ ID NO:3, excluyendo las modificaciones de aminoácidos. El polipéptido FVII modificado aquí proporcionado puede ser un polipéptido humano, un polipéptido no humano y/o un polipéptido maduro. En algunos ejemplos, solamente se modifica la secuencia primaria. En otros ejemplos, una modificación química o una modificación post-traduccional

55

también se incluye. Por ejemplo, el polipéptido FVII modificado puede ser glicosilado, carboxilado, hidroxilado, sulfatado, fosforilado, albuminado, o conjugado con una porción de polietilenglicol (PEG).

Los polipéptidos FVII modificados aquí proporcionados pueden ser polipéptidos de cadena sencilla, polipéptidos de dos cadenas y/o activos o activados. La activación puede ser efectuada oir la escisión proteolítica por autoactivación, escisión por Factor IX (FIXa), escisión por Factor X (FXa), escisión por Factor XII (FXIIa), o escisión por trombina.

Los polipéptidos FVII modificados aquí proporcionados can retener una o más actividades del polipéptido FVII no modificado. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados pueden contener modificaciones en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 60 posiciones de aminoácidos con tal de que el polipéptido retenga al menos una actividad FVII del polipéptido FVII no modificado. Tales polipéptidos FVII modificados pueden retener al menos alrededor de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más de una actividad del polipéptido FVII no modificado. En algunos ejemplos, una o más actividades son seleccionadas de entre enlace al factor de tejido (TF), activación por factor X (FX), activación por Factor IX (FIX), enlace a fosfolípidos, y actividad de coagulación. Además, las actividades que se retienen se pueden aumentar o disminuir en comparación con el polipéptido FVII no modificado. En algunos ejemplos, la actividad de coagulación se incrementa en comparación con el

Sb

polipéptido FVII no modificado, tal como al menos alrededor de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más de la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado. Las actividades se pueden medir in vitro, ex vivo o in vivo.

Se proporcionan en la presente moléculas de ácidos nucleicos que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos FVII modificados aquí proporcionados. También se proporcionan vectores que contienen tales moléculas de ácidos nucleicos, incluyendo vectores procarióticos, vectores virales, o vectores eucarióticos, tales como un vector de mamíferos. Los vectores vírales pueden ser seleccionados de entre un adenovirus, un virus asociado con adeno, un retrovirus, un virus de herpes, un lentivirus, un virus de viruela, y un citomegalovirus. Se proporcionan en la presente células que contienen estos vectores, incluyendo células eucarióticas, tales como células de mamíferos. Ejemplos de las células de mamíferos con las células de riñón de hámster recién nacido (BHK-21) o células 293 cells o células CHO. En algunos ejemplos, las células expresa el polipéptido FVII modificado. Así, también se proporcionan en la presente polipéptidos FVII modificados que se producen por estas células.

Se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas que contienen una concentración o cantidad terapéuticamente efectiva de cualquier polipéptido FVII modificado, molécula de ácido nucleico, vector o célula aquí proporcionados en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos ejemplos, la

57

composición farmacéutica se formula para administración local, sistémica, o tópica, tal como administración oral, nasal, pulmonar bucal, transdérmica, subcutánea, intraduodenal, enteral, parenteral, intravenosa, o intramuscular. Las composiciones farmacéuticas también se pueden formular para administración por dosificación sencilla y/o liberación controlada.

Se proporcionan en la presente métodos de tratamiento de un sujeto por la administración de una composición farmacéutica aquí proporcionada, en donde el sujeto tiene una enfermedad o afección que se trata por la administración de FVII o un procoagulante, tal como por al administración de FVII activo (FVIIa). En algunos ejemplos, el tratamiento con la composición farmacéutica aminora o alivia los síntomas asociados con la enfermedad o afección. En ejemplos adicionales, los métodos aquí proporcionados también incluyen el monitoreo del sujeto para cambios en los síntomas asociados con la enfermedad o afección que se trata por la administración de FVII o un procoagulante. La enfermedad o afección a tratarse al usar los métodos aquí proporcionados puede ser seleccionada de entre trastornos de coagulación sanguínea, trastornos hematológicos, trastornos de sangrado, hemofilia (tal como es la hemofilia A o hemofilia B o hemofilia C, hemofilia congénita o adquirida), deficiencia del factor VII y trastornos de sangrado, incluyendo complicación por sangrado debida a cirugía (tal como cirugía del corazón, angioplastia, cirugía de pulmón, cirugía abdominal, cirugía espinal, cirugía cerebral, cirugía vascular, cirugía dental, o cirugía para transplante de órganos) o

58

trauma. En algunos ejemplos, el sangrado se manifiesta como hemartrosis agudas, artropatía hemofílica crónica, hematomas, hematuria, sangrados del sistema nervioso central, sangrados gastrointestinales, o hemorragia cerebral. En ejemplos adicionales, el sangrado se debe a extracción dental. La cirugía de transplante puede ser seleccionada de entre transplante de médula ósea, corazón, pulmón, páncreas, e hígado.

En algunos ejemplos, el método aquí proporcionado puede ser usado para tratar un sujeto que tiene autoanticuerpos para el factor VIII o factor IX. Los métodos aquí proporcionados también pueden incluir administrar uno o más factores de coagulación adicionales, tal como factores de coagulación recombinantes o purificados de plasma, procoagulantes, tal como vitamina K, derivado de vitamina K e inhibidores de proteína C, plasma, plaquetas, células de glóbulos rojos y corticosteroides, o tratamientos.

Se proporcionan en la presente artículos de manufactura que contienen material de empaque y una composición farmacéutica aquí proporcionada contenida dentro del material de empaque. En algunos ejemplos, el polipéptido FVII modificado en la composición farmacéutica es efectivo para el tratamiento de un trastorno o enfermedad mediado por FVII, y el material de empaque incluye una etiqueta que indica que el polipéptido FVII modificado es usado para el tratamiento de un trastorno o enfermedad mediado por FVII. También se proporcionan en la presente kits, que comprenden una composición farmacéutica aquí descrita, un dispositivo para

59

la administración de la composición y, opcionalmente, instrucciones para la administración.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 detalla la cascada de coagulación. La figura muestra la trayectoria intrínseca y la trayectoria extrínseca de la coagulación para la producción independiente de FXa, y la convergencia de las trayectorias a una trayectoria común para generar trombina y fibrina para la formación de un coágulo. Estas trayectorias están interconectadas. La figura detalla el orden de las moléculas involucradas en la cascada de activación en la cual un zimógeno se convierte a una proteasa activada por escisión de uno o más enlaces péptidos. La proteasa activada luego sirve como la proteasa de activación para la siguiente molécula de zimógeno en la cascada, lo que resulta finalmente en la formación de coágulo.

La Figura 2 detalla el modelo de coagulación basado en la célula (ver por ejemplo Hoffman et al. (2001) Thromb Haemost 85:958-965). La figura detalla los eventos de coagulación cuando se separan en tres fases, donde el inicio de la coagulación se efectúa por la activación de FX a FXa por el complejo TF/FVIIa sobre la célula que lleva TF, lo que resulta en la generación de una cantidad pequeña de trombina después de la activación por FXa/FVa. La amplificación tiene lugar cuando la trombina se enlaza a y active las plaquetas, e inicia la activación de cantidades suficientes de los factores de coagulación apropiados para formar los complejos

60

de FVIIIa/FIXa y FVa/FXa. La propagación de la coagulación sucede sobre la superficie de grandes números de plaquetas activadas en el sitio de la lesión, lo que resulta en un estallido de generación de trombina que es suficientemente grande para generar suficiente fibrina a partir del fibrinógeno para establecer un coágulo en el sitio de la lesión.

La Figura 3 detalla los mecanismos por los cuales FVIIa puede iniciar la formación de trombina. La figura ilustra la trayectoria dependiente de la generación de trombina de FVIIa FVIIa, la cual actúa en la superficie de la célula que transporta TF e involucra la formación de complejos de FVIIa con TF previo a la activación de FX a FXa. La figura también detalla la trayectoria independiente de TF de la generación de trombina de FVIIa, durante la cual FVIIa se enlaza a fosfolípidos sobre la plaqueta activada y activa FX a FXa, lo cual a su vez forma complejos con FVa para escindir la protrombina en trombina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Introducción

A. Definiciones

B. Descripción General de la Hemostasis

1. Adhesión y agregación de plaquetas

2. Cascada de coagulación

a. Inicio

b. Amplificación

c. Propagación

61

3. Regulación de la Coagulación

C. Factor VII (FVII)

1. Estructura y organización de FVII

2. Modificaciones post-traduccionales

3. Procesamiento de FVII

4. Activación de FVII

5. Función de FVII

a. Actividad de FVIIa dependiente del factor de tejido

b. Actividad de FVIIa independiente del factor de tejido

6. FVII como biofarmacéutico

D. Polipéptidos FVII modificados

1. Actividad catalítica aumentada

a. Modificaciones ejemplares para aumentar la actividad catalítica

i. Sustituciones básicas de aminoácidos en la posición 286

ii. Otras mutaciones en la posición 286

2. Resistencia incrementada a AT-III

Modificaciones ejemplares para efectuar resistencia incrementada a AT-III

3. Resistencia incrementada a inhibición por Zn^{2+}

Modificaciones ejemplares para incrementar la resistencia a la inhibición por Zn^{2+}

4. Glicosilación alterada

Modificaciones ejemplares para alterar la glicosilación

5. Enlace aumentado para albúmina de suero y/o integrina

de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$

a. Polipéptidos FVII ejemplares con secuencias de enlace a la albúmina de suero

b. Polipéptidos FVII ejemplares con secuencias de enlace a integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$

6. Modificación por la introducción de un dominio heterólogo Gla

7. Combinaciones y Modificaciones Adicionales

a. Modificaciones que incrementan la resistencia a TFPI

b. Modificaciones que incrementan la actividad intrínseca

c. Modificaciones que incrementan la resistencia a proteasas

d. Modificaciones que incrementan la afinidad para fosfolípidos

e. Modificaciones que alteran la glicosilación

f. Modificaciones para facilitar la ligadura de grupos químicos

g. Mutaciones ejemplares de combinación

E. Producción de los polipéptidos FVII

1. Vectores y células

2. Sistemas de expresión

a. Expresión procariótica

b. Levaduras

c. Insectos y células de insectos

d. Células mamíferas

e. Plantas

63

2. Purificación

3. Proteínas de fusión

4. Modificaciones de polipéptidos

5. Secuencias de nucleótidos

F. Evaluación de las actividades del polipéptido FVII modificado

1. Ensayos in vitro

a. Modificación post-traduccional

b. Actividad proteolítica

c. Actividad de coagulación

d. Enlace a y/o inhibición por otras proteínas

e. Enlace a fosfolípidos

2. Modelos animales no humanos

3. Ensayos clínicos

G. Formulación y administración

1. Formulaciones

a. Dosificaciones

b. Formas de dosificación

2. Administración de polipéptidos FVII modificados

3. Administración de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos FVII modificados (terapia génica)

H. Usos Terapéuticos

1. Trastornos de sangrado congénitos

a. Hemofilia

b. Deficiencia por FVII

c. Otros

2. Trastornos de sangrado adquiridos

a. Trombocitopenia adquirida por quimioterapia

64

b. Otras coagulopatías

c. Sangrado adquirido por transplantes

d. Sangrado inducido por terapias anticoagulantes

e. Hemofilia adquirida

3. Trauma y sangrado quirúrgico

I. Terapias de Combinación

J. Artículos de manufactura y kits

K. Ejemplos

A. Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por alguien experto en la técnica a quien pertenece la invención(es). Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes publicadas y publicaciones, secuencias del Genbank, bases de datos, sitios web y otros materials publicados referidos a lo largo de la descripción complete en la presente, a menos que se señale de otra manera, se incorporan como referencia en su totalidad. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos en la presente, prevalecerán aquellos en esta sección. Donde se haga referencia a un URL u otro de tal identificador o dirección, se entiende que tales identificadores pueden cambiar y que puede ir y venir la información en la internet, pero se puede encontrar información equivalente al buscar en internet. La referencia a ello hace evidente la disponibilidad y diseminación pública de tal información.

Como se usa en este documento, trayectoria de coagulación

65

o cascada de coagulación se refiere a la serie de eventos de activación que conduce a la formación de un coágulo de fibrina insoluble. En la trayectoria o cascada de coagulación, una proteína inactiva de una serina proteasa (también llamada un zimógeno) se convierte a una proteasa activa por escisión de uno o más enlaces de péptidos, lo cual luego sirve como la proteasa activante para la siguiente molécula de zimógeno en la cascada. En la etapa final proteolítica de la cascada, el fibrinógeno se escinde proteolíticamente por la trombina a la fibrina, el cual luego se reticula en el sitio de la lesión para formar un coágulo.

Como se usa en este documento, "hemostasis" se refiere a la supresión del sangrado o flujo sanguíneo en un órgano o parte del cuerpo. El término hemostasis puede abarcar el proceso completo de coagulación sanguínea para evitar la pérdida de sangre que sigue a la lesión de los vasos sanguíneos hasta la disolución posterior del coágulo sanguíneo que sigue a la reparación del tejido.

Como se usa en este documento, "formación de coágulos" o "coagulación" se refiere a la formación de un coágulo insoluble de fibrina, o al proceso por el cual los factores de coagulación de la sangre interactúan en la cascada de coagulación, lo que resulta finalmente en la formación de un coágulo insoluble de fibrina.

Como se usa en este documento, una "proteasa" es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos covalentes. Estas designaciones incluyen formas de zimógeno y formas activadas de cadena sencilla, de dos, o múltiples de las

66

mismas. Por cuestión de claridad, la referencia a las proteasas se refiere a todas las formas. Proteasas incluyen, por ejemplo, serina proteasas, cisteína proteasas, aspartico proteasas, treonina y metalo-proteasas dependiendo de la actividad catalítica de su sitio activo y mecanismo de escisión de los enlaces péptidos de un sustrato objetivo.

Como se usan en la presente, serina proteasas o serina endopeptidasas se refiere a una clase de peptidasas, las cuales se caracterizan por la presencia de un residuo de serina en el sitio activo de la enzima. Las serina proteasas participant en un amplio rango de funciones en el cuerpo, incluyendo la coagulación sanguínea y la inflamación, así como el funcionamiento como enzimas digestivas en procariotas y eucariotas. El mecanismo de escisión por serina proteasas se basa en el ataque nucleofílico de un enlace peptídico atacado por una serina. Cisteína, treonina o moléculas de agua asociadas con aspartato o metales también pueden jugar este rol. Las cadenas laterales alineadas de serina, histidina y aspartato forman una triada catalítica común a la mayoría de las serina proteasas. El sitio activo de serina proteasas se forma como una hendidura donde se enlaza el sustrato del polipéptido.

Como se usan en la presente, Factor VII (FVII, F7; también referido como como Factor 7, factor VII de coagulación, factor VII de suero, acelerador de la conversión de protrombina en suero, SPCA, proconvertina y eptacog alfa) se refiere a una serina proteasa que es parte de la cascada de coagulación. FVII incluye un dominio Gla, dos dominios EGF (EGF-1 y EGF-2), y un

67

dominio de serina proteasa (o dominio de peptidasa S1) que está altamente conservado entre todos los miembros de la familia de la peptidasa S1 de serina proteasas, tal como por ejemplo con quimiotripsina. La secuencia de un precursor ejemplar FVII que tiene un péptido de señal y propéptido está establecida en SEQ ID NO: 1. Un polipéptido maduro FVII ejemplar está establecido en SEQ ID NO:3. FVII se presenta como un zimógeno de cadena sencilla, un polipéptido de dos cadenas tipo zimógeno y una forma completamente activada de dos cadenas. La activación complete, que se presenta con el cambio conformacional de una forma tipo zimógeno, sucede con el enlace a su factor de tejido de co-factor. También, se pueden introducir mutaciones que resulten en el cambio de conformación en la ausencia del factor de tejidos. Así, la referencia a FVII incluye formas de cadena sencilla y de dos cadenas del mismo, incluyendo formas de tipo zimógeno y de dos cadenas completamente activadas.

La referencia al polipéptido FVII también incluye polipéptidos precursores y polipéptidos maduros FVII en formas de cadena sencilla o dos cadenas, formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especies, variantes codificadas por variantes de empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencias al polipéptido precursor establecido en SEQ ID NO: 1 o la forma madura del mismo. Se incluyen polipéptidos FVII modificados, tal como aquellos de SEQ ID NOS: 113 y 273 y variantes de los mismos. También se incluyen aquellos que conservan al menos una

000038

actividad de un FVII, tal como enlace a TF, enlace a factor X, enlace a fosfolípidos, y/o actividad coagulante de un FVII. Al retener la actividad, la actividad puede ser alterada, tal como reducida o incrementada, como en comparación con un FVII de tipo silvestre con tal de que el nivel de actividad retenido sea suficiente para producir un efecto detectable. Los polipéptidos FVII incluyen, pero no se limitan a, isoformas específicas de tejidos y variantes alélicas de los mismos, moléculas sintéticas preparadas por la traducción de ácidos nucleicos, proteínas generadas por síntesis química, tales como síntesis que incluyen ligamiento de polipéptidos más cortos, a través de métodos recombinantes, proteínas aisladas de tejido y células humanas y no humanas, polipéptidos quiméricos FVII y formas modificadas de los mismos. Los polipéptidos FVII también incluyen fragmentos o porciones de FVII que tienen una longitud suficiente o que incluyen regiones apropiadas para retener al menos una actividad (con activación si es necesario) de un polipéptido maduro de longitud completa. Los polipéptidos FVII también incluyen aquellas que contienen modificaciones químicas o post-traduccionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas o post-traduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica.

Los polipéptidos FVII ejemplares son aquellos de origen mamífero, incluyendo humanos. Las secuencias de aminoácidos ejemplares de FVII de origen humano están establecidas en SEQ

69

ID NOS: 1, 2, y 3. Las variantes ejemplares de tal FVII polipéptido humano, que incluye cualquiera de los polipéptidos precursores establecidos en SEQ ID NOS:18-74. Los polipéptidos FVII también incluyen cualquiera de origen no humano incluyendo, pero no limitado a, murino, canino, felino, leporino, aviar, bovino, ovino, porcino, equino, piscino, ranino, y otros polipéptidos de factor VII del primate. Los polipéptidos FVII ejemplares de origen no humano incluyen, por ejemplo, vaca (*Bos taurus*, SEQ ID NO:4), ratón (*Mus musculus*, SEQ ID NO:5), chimpancé pigmeo (*Pan paniscus*, SEQ ID NO:6), chimpancé (*Pan troglodytes*, SEQ ID NO:7), conejo (*Oryctolagus cuniculus*, SEQ ID NO:8), rat (*Rattus norvegicus*, SEQ ID NO: 9), mono rhesus (*Macaca mulatto*, SEQ ID NO: 10), cerdo (*Sus scrofa*, SEQ ID NO:11), dog (*Canis familiaris*, SEQ ID NO: 12), pez cebra (*Brachydanio rerio*, SEQ ID NO: 13), pez globo japonés (*Fugu rubripes*, SEQ ID NO: 14), pollo (*Gallus gallus*, SEQ ID NO: 15), orangután (*Pongo pygmaeus*, SEQ ID NO: 16) y gorila (*Gorilla gorilla*, SEQ ID NO: 17).

Alguien experto en la técnica reconoce que las posiciones referidas del polipéptido maduro del factor VII (SEQ ID NO:3) difiere por 60 residuos de aminoácidos cuando en comparación con la isoforma un polipéptido precursor FVII establecido en SEQ ID NO: 1, que es la isoforma de un polipéptido del factor VII que contiene las secuencias del péptido de señal y propéptidos. Así, el primer residuo de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 "corresponde a" el sexagésimo primer (61°.) residuo de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Alguien experto en la técnica también reconoce que las posiciones referidas del polipéptido

maduro del factor VII (SEQ ID NO: 3) difiere por 38 residuos de aminoácidos cuando en comparación con el polipéptido precursor FVII establecido en SEQ ID NO:2, que es el polipéptido de factor VII de la isoforma b que contiene las secuencias del péptido de señal y de propéptidos. Así, el primer residuo de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 "corresponde a" el trigésimo noveno (39°.) residuo de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

Como se usa en este documento, residuos correspondientes se refieren a residuos que se presentan en los lugares alineados. Los polipéptidos relacionados o variantes se alinean por cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica. Tales métodos típicamente maximizan las coincidencias, e incluyen métodos tales como el uso de alineaciones manuales y el uso de diversos programas de alineación disponibles (por ejemplo, BLASTP) y otros conocidos por aquellos expertos en la técnica. Al alinear las secuencias de polipéptidos, alguien experto en la técnica puede identificar los residuos correspondientes, al usar residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. Por ejemplo, al alinear las secuencias de los polipéptidos del factor VII, alguien experto en la técnica puede identificar residuos correspondientes, usando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. Por ejemplo, la alanina en la posición de aminoácido 1 (A1) de SEQ ID NO:3 (factor VII maduro) corresponde a la alanina en la posición de aminoácido 61 (A61) de SEQ ID NO:1, y la alanina en la posición de aminoácido 39 (A39) de SEQ ID NO:2. En otros casos, pueden identificarse las regiones que corresponden. Por ejemplo, el dominio Gla corresponde a posiciones de aminoácidos A1 a la F45

de SEQ ID NO:3, a posiciones de aminoácidos A61 a la S105 de SEQ ID NO:1 y a posiciones de aminoácidos A39 a S83 de SEQ ID NO:2. Alguien experto en la técnica también puede emplear residuos de aminoácidos conservados como guía para encontrar residuos correspondientes de aminoácidos entre las secuencias dos o más humanas y no humanas. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos S43 y E163 de SEQ ID NO:3 (humana) corresponden a S83 y E203 de SEQ ID NO: 4 (bovino). Las posiciones correspondientes también se pueden basar en alineaciones estructurales, por ejemplo al usar alineaciones simuladas por computadora de la estructura de proteínas. En otros casos, se pueden identificar las regiones correspondientes.

Como se usa en este documento, una "proregión," "propéptido," o "pro secuencia," se refiere a una región o un segmento que se escinde para producir una proteína madura. Esto puede incluir segmentos que funcionan para suprimir la actividad proteolítica al ocultar la maquinaria catalítica y evitar así la formación del intermediario catalítico (es decir, al obstruir estéricamente el sitio de enlace al sustrato). Una proregión es una secuencia de aminoácidos posicionada en la terminación amino de un polipéptido maduro biológicamente activo u puede ser tan pequeña como unos cuantos aminoácidos o puede ser una estructura de multidominios.

Como se usa en este documento, "factor VII maduro" se refiere a un polipéptido FVII que carece de una secuencia de señal y una secuencia de propéptido. Típicamente, una secuencia de señal ataca una proteína por secreción por medio de la trayectoria retículo endoplásmico (ER)-golgi y se escinde

72

después de la inserción dentro de ER durante la traducción. Una secuencia de propéptido típicamente funciona en modificación post-traduccional de la proteína y se escinde previo a la secreción de la proteína desde la célula. Así, un polipéptido maduro FVII es típicamente una proteína secretada. En un ejemplo, un polipéptido FVII maduro humano es establecido en SEQ ID NO:3. La secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3 difiere de aquella de los polipéptidos precursores establecidos en SEQ ID NOS:1 y 2 en que SEQ ID NO:3 carece de la secuencia de señal, la cual corresponde a residuos de aminoácidos 1-20 de SEQ ID NOS:1 y 2; y también carece de la secuencia de propéptido, la cual corresponde a los residuos de aminoácidos 21-60 de SEQ ID NO:1 y los residuos de aminoácidos 21-38 de SEQ ID NO:2. La referencia a un polipéptido maduro FVII abarca la forma de zimógeno de cadena sencilla y la forma de dos cadenas.

Como se usa en este documento, "tipo silvestre " o "nativo" con referencia a FVII se refiere a un polipéptido FVII codificado por un gen FVII nativo o que se presenta naturalmente, incluyendo variantes alélicas, que está presente en un organismo, incluyendo un humano y otros animales, en la naturaleza. La referencia al factor VII de tipo silvestre sin referencia a una especie se pretende que abarque cualquier especie de un factor VII de tipo silvestre. Se incluyen entre los polipéptidos FVII de tipo Silvestre el polipéptido precursor codificado, fragmentos del mismo, y formas procesadas del mismo, tal como una forma madura que carece del péptido de señal así como algunas formas pre- o post-traduccionalmente

procesadas o modificadas del mismo. También se incluyen entre los polipéptidos FVII nativos aquellos que se modifican post-traduccionalmente, incluyendo, pero no limitado a, modificación por glicosilación, carboxilación y hidroxilación. Los polipéptidos FVII nativos también incluyen formas de cadena sencilla y de dos cadenas. Por ejemplo, los humanos expresan el FVII nativo. La secuencia de aminoácidos de FVII humano ejemplar de tipo silvestre está establecida en SEQ ID NOS: 1, 2, 3 y variantes alélicas establecidas en SEQ ID NOS:44-100 y las formas maduras de las mismas. Otros animales producen FVII nativo, incluyendo, pero no limitado a, vaca (*Bos Taurus*, SEQ ID NO:4), ratón (*Mus musculus*, SEQ ID NO:5), chimpancé pigmeo (*Pan paniscus*, SEQ ID NO:6), chimpancé (*Pan troglodytes*, SEQ ID NO:7), conejo (*Oryctolagus cuniculus*, SEQ ID NO:8), rat (*Rattus norvegicus*, SEQ ID NO: 9), mono rhesus (*Macaca mulatta*, SEQ ID NO: 10), cerdo (*Sus scrofa*, SEQ ID NO:11), dog (*Canis familiaris*, SEQ ID NO: 12), pez cebra (*Brachydanio rerio*, SEQ ID NO: 13) pez globo japonés (*Fugu rubripes*, SEQ ID NO: 14), pollo (*Gallus gallus*, SEQ ID NO: 15), orangután (*Pongo pygmaeus*, SEQ ID NO: 16) y gorilla (*Gorilla gorilla*, SEQ ID NO: 17).

Como se usa en este documento, las variantes de especie se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamíferos, tal como ratón y humano.

Como se usa en este documento, variantes alélicas se refiere a variaciones en las proteínas entre miembros de la misma especie. Como se usa en este documento, una variante de

empalme se refiere a una variante producida por procesamiento diferencial de un transcrito primario de ADN genómico que resulta en más de un tipo de mRNA.

Como se usa en este documento, un zimógeno se refiere a una proteasa que se activa por escisión proteolítica, incluyendo escisión por maduración, tal como escisión por activación, y/o formación de complejos con otra(s) proteína(s) y/o cofactor(es). Un zimógeno es un precursor inactivo de una enzima proteolítica. Tales precursores son generalmente más grandes, aunque no necesariamente más grandes, que la forma activa. Con referencia a las serina proteasas, los zimógenos se convierten en enzimas activas por escisión específica, incluyendo escisión catalítica o autocatalítica, o por enlace de un co-factor de activación, el cual genera una enzima activa. Por ejemplo, generalmente los zimógenos están presentes en una forma de cadena sencilla. Los zimógenos generalmente están inactivos y pueden ser convertidos a polipéptidos activos maduros por escisión catalítica o autocatalítica en uno o más sitios proteolíticos, para generar una cadena múltiple tal como un polipéptido de dos cadenas. Un zimógeno así, es una proteína enzimáticamente inactiva que se convierte a una enzima proteolítica por la acción de un activador. La escisión puede ser efectuada por autoactivación. Diversas proteínas de coagulación son zimógenos; son inactivas, pero se escinden y se activan con el inicio del sistema de coagulación que sigue al daño vascular. Con referencia a FVII, los polipéptidos FVII existen en el plasma sanguíneo como zimógenos hasta la escisión por aproteasas, tal como por ejemplo, factor IX activado

000045

(FIXa), factor X activado (FXa), factor XII activado (FXIIa), trombina, o por autoactivación para producir una forma de dos cadenas tipo zimógeno, la cual luego requiere de cambio de conformación adicional para plena actividad.

Como se usa en este documento, una proteína o polipéptido "tipo zimógeno" se refiere a una proteína que ha sido activada por la escisión proteolítica, pero que todavía muestra propiedades que se asocian con un zimógeno, tal como, por ejemplo, poca o ninguna actividad, o una conformación que se asemeje a la conformación de la forma de zimógeno de la proteína. Por ejemplo, cuando no se enlaza a un factor de tejido, la forma activada de dos cadenas de FVII es una proteína tipo zimógeno; retiene una conformación similar a un zimógeno no escindido FVII, y así, muestra muy baja actividad. Al enlazarse a un factor de tejido, la forma activada de dos cadenas de FVII se somete a un cambio conformaiconal y adquiere su actividad plena como un factor de coagulación.

Como se usa en este documento, una secuencia de activación se refiere a una secuencia de aminoácidos en un zimógeno que es el sitio requerido para escisión por activación o escisión por maduración para formar una proteasa activa. La escisión de una secuencia de activación se puede catalizar autocatalíticamente o por compañeros de activación.

Como se usa en este documento, escisión por activación es un tipo de escisión por maduración, el cual induce a un cambio por conformación que se requiere para el desarrollo de la actividad enzimática completa. Esto es una trayectoria clásica de activación, por ejemplo, para serina proteasas en la cual

una escisión genera un nuevo término en N que interactúa con las regiones conservadas de la proteasa, tal como Asp 194 en la quimiotripsina, para inducir cambios conformacionales requeridos para actividad. La activación puede resultar en la producción de formas de cadena múltiple de las proteasas. En algunos casos, las formas de cadena sencilla de la proteasa pueden mostrar actividad proteolítica.

Como se usa en este documento, "Factor VII activado" o "FVIIa" se refiere a cualquier forma de dos cadenas de un polipéptido FVII. Una forma de dos cadenas típicamente resulta de la escisión proteolítica, pero puede ser producida sintéticamente. El Factor VII activado, incluye así la forma de dos cadenas tipo zimógeno con baja actividad coagulante, una forma completamente activada (alrededor de 1000 veces más actividad) que se presenta con el enlace a factor de tejidos, y formas mutadas que existen en una forma de dos cadenas completamente activadas o que se someten a un cambio por conformación a una forma completamente activada. Por ejemplo, una forma de cadena sencilla del polipéptido FVII (ver, por ejemplo, SEQ ID NO:3) se escinde proteolíticamente entre los residuos de aminoácidos R152 e I153 del polipéptido maduro FVII. Los productos de escisión, cadena pesada de FVII y cadena ligera de FVII, que se mantienen juntos por un enlace disulfuro (entre los residuos de aminoácidos C135 y C262 en el FVII de SEQ ID NO:3), forman la enzima activadas de dos cadenas FVII. La escisión proteolítica puede ser llevada a cabo, por ejemplo, por el factor IX activado (FIXa), factor X activado (FXa), factor XII activado (FXIIa), trombina, o por autoactivación.

77

Como se usa en este documento, una "propiedad" de un polipéptido FVII se refiere a una propiedad física o estructural property, tal como estructura tridimensional, pi, vida media, conformación y otras de tales características físicas.

Como se usa en este documento, una "actividad" de un polipéptido FVII se refiere a cualquier actividad mostrada por un polipéptido de factor VII. Tales actividades se pueden probar in vitro y/o in vivo e incluyen, pero no se limitan a, coagulación o actividad coagulante, actividad pro-coagulante, actividad catalítica o proteolítica tal como efectuar la activación de factor X (FX) o la activación del Factor IX (FIX); antigenicidad (capacidad para enlazar a o competir con un polipéptido para enlace a un anticuerpo anti-FVII); capacidad de enlazar al factor de tejido, factor X o factor IX; y/o capacidad para enlazar a fosfolípidos. La actividad puede ser evaluada in vitro o in vivo usando ensayos reconocidos, por ejemplo, al medir la coagulación in vitro o in vivo. Los resultados de tales ensayos indican que un polipéptido muestra una actividad que puede ser correlacionada con la actividad del polipéptido in vivo, en la cual la actividad in vivo puede ser referida como actividad biológica. Los ensayos para determinar la funcionalidad o actividad de formas modificadas de FVII se conocen por aquellos expertos en la técnica. Los ensayos ejemplares para evaluar la actividad de un polipéptido FVII incluyen ensayo de tiempo de protromboplastina (PT) o el ensayo de tiempo de protromboplastina parcial activado (aPTT) para evaluar la actividad coagulante, o ensayos cromogénicos al usar

78

000048

sustratos sintéticos, tales como los descritos en los Ejemplos a continuación, para evaluar la actividad catalítica o proteolítica.

Como se usa en este documento, "muestra al menos una actividad" o "retiene al menos una actividad" se refiere a la actividad mostrada por un polipéptido FVII modificado cuando en comparación con un polipéptido FVII no modificado de la misma forma y bajo las mismas condiciones. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado en una forma de dos cadenas se compara con un polipéptido FVII no modificado en una forma de dos cadenas, bajo las mismas condiciones experimentales, en donde la única diferencia entre los dos polipéptidos es la modificación bajo estudio. En otro ejemplo, un polipéptido FVII modificado en una forma de cadena sencilla es en comparación con un polipéptido FVII no modificado en una forma de cadena sencilla, bajo las mismas condiciones experimentales, donde la única diferencia entre los dos polipéptidos es la modificación bajo estudio. Típicamente, un polipéptido FVII modificado que retiene o muestra al menos una actividad de un polipéptido FVII no modificado de la misma forma retiene una cantidad suficiente de la actividad tal que, cuando se administra in vivo, el polipéptido FVII modificado es terapéuticamente efectivo como un terapéutico procoagulante. Generalmente, para que un polipéptido FVII modificado retenga eficacia terapéutica como un procoagulante, la cantidad de actividad que se retiene está o es alrededor de 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o

79

más de la actividad de un polipéptido FVII no modificado de la misma forma que despliega eficacia terapéutica como un procoagulante. La cantidad de actividad que se require para mantener eficacia terapéutica como un procoagulante puede ser determinada empíricamente, si es necesario. Típicamente, la retención de 0.5% a 20%, 0.5% a 10%, 0.5% a 5% de una actividad es suficiente para retener la eficacia terapéutica como un procoagulante in vivo.

Se entiende que la actividad que se muestra o conserva por un polipéptido FVII modificado puede ser cualquier actividad, incluyendo, pero no limitado a, coagulación o actividad coagulante, actividad pro-coagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como para efectuar la activación del factor X o la activación del Factor IX (FIX); antigenicidad (capacidad para enlazar a o competir con un polipéptido para enlace a un anticuerpo anti-FVII); capacidad de enlace a un factor de tejido, factor X o factor IX; y/o capacidad para enlazar a fosfolípidos. En algunas instancias, un polipéptido FVII modificado puede retener una actividad que se incrementa en comparación con un polipéptido FVII no modificado. En algunos casos, un polipéptido FVII modificado puede conservar una actividad que se disminuye en comparación con un polipéptido FVII no modificado. La actividad de un polipéptido FVII modificado puede ser cualquier nivel de porcentaje de actividad del polipéptido no modificado, en donde ambos polipéptidos están en la misma forma, incluyendo pero no limitado a, 1% de la actividad, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%,

500%, o más actividad en comparación con el polipéptido que no contiene la modificación en cuestión. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede mostrar actividad aumentada o disminuida en comparación con el polipéptido FVII no modificado de la misma manera. Por ejemplo, puede retener al menos alrededor de o 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o al menos 99% de la actividad del polipéptido FVII no modificado. En otras modalidades, el cambio en actividad es al menos alrededor de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, o más veces mayor que el FVII no modificado. El nivel particular a retenerse es una función del uso pretendido del polipéptido y puede determinarse empíricamente. La actividad puede medirse, por ejemplo, al usar ensayos in vitro o in vivo tal como aquellos descritos en la presente o en los Ejemplos a continuación.

Como se usa en este documento, "actividad de coagulación" o "actividad coagulante" o "actividad pro-coagulante" se refiere a la capacidad de un polipéptido para efectuar la coagulación. Los ensayos para evaluar la actividad coagulante se conocen por aquellos expertos en la técnica, e incluyen el ensayo de tiempo de protromboplastina (PT) o el ensayo de tiempo parcial activado de tromboplastina (aPTT).

Como se usa en este documento, "actividad catalítica" o "actividad proteolítica" con referencia a FVII se refiere a la

81

capacidad de una proteína FVII para catalizar la escisión proteolítica de un sustrato, y se usan de forma intercambiable. Los ensayos para evaluar tales actividades se conocen en la técnica. Por ejemplo, la actividad proteolítica de FVII se puede medir al usar sustratos cromogénicos tales como Spectrozyme FVIIa (CHsSCk-D-CHA-But-Arg- pNA), en donde la escisión del sustrato se monitorea por la absorbancia y la velocidad de hidrólisis del sustrato determinada por regresión lineal.

Como se usa en este documento, "actividad intrínseca" con referencia a FVII se refiere a la actividad catalítica, proteolítica, y/o coagulante de una proteína FVII en la ausencia del factor de tejido.

Como se usa en este documento, dominio (típicamente una secuencia de tres o más, generalmente 5 o 7 o más aminoácidos) se refiere a una porción de una molécula, tal como proteínas o los ácidos nucleicos que codifican, que son estructuralmente y/o funcionalmente distintos de otras porciones de la molécula y es identificable. Por ejemplo, los dominios incluyen aquellas porciones de una cadena de polipéptido que puede formar una estructura plegada independientemente dentro de una proteína constituida de una o más porciones estructurales y/o que se reconoce en virtud de una actividad funcional, tal como actividad proteolítica. Una proteína puede tener uno, o más de un dominio diferente. Por ejemplo, un dominio se puede identificar, definir o distinguir por homología de la secuencia en ello a miembros relacionados de la familia, tales como homología a porciones que definen un dominio de proteasa o un

82

dominio gla. En otro ejemplo, un dominio se puede distinguir por su función, tal como por la actividad proteolítica, o una capacidad de interactuar con una biomolécula, tal como enlace al ADN, enlace a ligandos, y dimerización. Un dominio puede mostrar independientemente una función o actividad biológica tal que el dominio independientemente o fusionado a otra molécula pueda efectuar una actividad, tal como, por ejemplo actividad proteolítica o enlace a ligandos. Un dominio puede ser una secuencia lineal de aminoácidos o una secuencia no lineal de aminoácidos. Muchos polipéptidos contienen una pluralidad de dominios. Tales dominios se conocen, y se pueden identificar por aquellos expertos en la técnica. Para ejemplificación en la presente, se proporcionan definiciones, pero se entiende que está bien dentro de la experiencia de la técnica reconocer dominios particulares por nombre. Si es necesario, un software apropiado puede ser empleado para identificar dominios.

Como se usa en este documento, un dominio de proteasa es la porción catalíticamente activa de una proteasa. La referencia a un dominio de proteasa de una proteasa incluye las formas sencilla, de dos y de cadena múltiple de cualquiera de estas proteínas. Un dominio de proteasa de una proteína contiene todas las propiedades requeridas de esa proteína requeridas para su actividad proteolítica, tal como por ejemplo, el centro catalítico. Con referencia a FVII, el dominio de proteasa comparte homología y aspectos estructurales con los dominios de proteasa de la familia de la quimiotripsina/tripsina, incluyendo la triada catalítica. Por

83

ejemplo, en el polipéptido maduro FVII establecido en SEQ ID NO:3, el dominio de la proteasa corresponde a posiciones de aminoácidos 153 a 392.

Como se usa en este documento, un dominio de gamma-carboxiglutamato (Gla) se refiere a la porción de una proteína, por ejemplo una proteína dependiente de la vitamina K, que contiene modificaciones post-traduccionales de residuos de glutamato, generalmente la mayoría, pero no todos de los residuos de glutamato, por carboxilación dependiente de la vitamina K para formar Gla. El dominio Gla es responsable del enlace de alta afinidad de los iones de calcio y el enlace a los fosfolípidos cargados negativamente. Típicamente, el dominio Gla inicia en la extremidad N-terminal de la forma madura de las proteínas dependientes de la vitamina K y termina con un residuo aromático conservado. En un polipéptido maduro FVII el dominio Gla corresponde a las posiciones de aminoácidos 1 a 45 del polipéptido ejemplar establecido en SEQ ID NO:3. Los dominios Gla son bien conocidos y sus lugares se pueden identificar en polipéptidos particulares. Los dominios Gla de las diversas proteínas dependientes de la vitamina K, comparten homología de secuencias, estructural y funcional, incluyendo el agrupamiento de residuos hidrofóbicos en el N-terminal dentro de un parche hidrofóbico que medie la interacción con fosfolípidos cargados negativamente sobre la membrana de la superficie de la célula. Ejemplos de otros polipéptidos que contienen Gla incluyen, pero no se limitan a, FIX, FX, protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína Gla de matriz, proteína 6 específica de la suspensión del

84

crecimiento (Gas6), y proteína Z. Los dominios Gla de estas y otras proteínas ejemplares están establecidos en cualesquiera de SEQ ID NOS: 83-94.

Como se usa en este documento, "nativo" o "endógeno" con referencia a un dominio Gla se refiere al dominio Gla que se presenta naturalmente asociado con todo o una parte de un polipéptido que tiene un dominio Gla. Para los propósitos en la presente, un dominio nativo Gla es con referencia a un polipéptido FVII. Por ejemplo, el dominio nativo Gla de FVII, establecido en SEQ ID NO:92, corresponde a aminoácidos 1-45 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3.

Como se usa en este documento, un dominio heterólogo Gla se refiere al dominio Gla de un polipéptido, desde la especie igual o diferente, que no es un dominio FVII Gla. Ejemplos de dominios heterólogos Gla son los dominios Gla a partir de polipéptidos que contienen Gla incluyendo, pero no limitado a, FIX, FX, protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína Gla de matriz, proteína 6 específica de la suspensión del crecimiento (Gas6), y proteína Z. Los dominios Gla de estas y otras proteínas ejemplares están establecidos en cualesquiera de SEQ ID NOS: 83-91, 93 y 94.

Como se usa en este documento, una porción contigua de un dominio Gla se refiere a al menos dos o más aminoácidos adyacentes, típicamente 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40 o más hasta todos los aminoácidos que constituyen un dominio Gla.

Como se usa en este documento, "una porción suficiente de un dominio Gla para efectuar el enlace a fosfolípidos" incluye al menos un aminoácido, típicamente, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15 o

85

más aminoácidos del dominio, pero menos que todos los aminoácidos que constituyen el dominio, con tal de que el polipéptido que contiene tal porción muestre enlace a fosfolípidos.

Como se usa en este documento, "reemplazar" con respect a un dominio Gla o "intercambio de dominio Gla" se refiere al proceso por el cual se reemplaza el dominio endógeno Gla de una proteína, al usar métodos recombinantes, sintéticos u otros métodos, con el dominio Gla de otra proteína. En el contexto de un "intercambio de dominio Gla", un "dominio Gla" es cualquier selección de aminoácidos de un dominio Gla y regiones adyacentes, que es suficiente para retener la actividad de enlace a fosfolípidos. Típicamente, un intercambio de dominio Gla involucrará el reemplazo de entre 40 y 50 aminoácidos de la proteína endógena con entre 40 y 50 aminoácidos de otra proteína, pero puede involucrar menos o más aminoácidos.

Como se usa en este documento, un dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (EGF-I o EGF-2) se refiere a la porción de una proteína que comparte homología de secuencias con una porción específica de 30 a 40 aminoácidos de la secuencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El dominio EGF incluye seis residuos de cisteína que se ha demostrado (en EGF) que están involucrados en los enlaces bisulfuro. La estructura principal de un dominio EGF es una lámina beta de dos hebras con un rizo en una lámina de dos hebras cortas en C-terminal. FVII contiene two EGF domains: EGF-I y EGF-2. Estos dominios corresponden a las posiciones de aminoácidos 46-82, y 87-128, respectivamente, del polipéptido

86

maduro FVII establecido en SEQ ID NO:3.

Como se usa en este documento, "polipéptido no modificado" o "FVII no modificado" y variaciones gramaticales de ello, se refieren a un polipéptido de partida que se selecciona para modificación como es aquí proporcionado. El polipéptido de partida puede ser una forma de tipo silvestre o que se presenta naturalmente de un polipéptido. Además, el polipéptido de partida puede ser alterado o mutado, tal que difiera de una isoforma de tipo silvestre nativa pero no obstante se refiera en la presente como un polipéptido de partida no modificado relativo a los polipéptidos posteriormente modificados producidos en la presente. Así, las proteínas existentes conocidas en la técnica que han sido modificadas para tener un incremento o disminución deseados en una actividad o propiedad en particular en comparación con una proteína de referencia no modificada se puede seleccionar y usar como el polipéptido de partida no modificado. Por ejemplo, una proteína que ha sido modificada de su forma natural por uno o más cambios sencillos de aminoácidos y posee ya sea un incremento o disminución en una propiedad deseada, tal como un cambio en un residuo o residuos de aminoácidos para alterar la glicosilación, puede ser una proteína objetivo, referida en la presente como no modificada, para una modificación adicional de ya sea la misma o diferente propiedad. Los polipéptidos FVII modificados ejemplares conocidos en la técnica incluyen cualquier polipéptido FVII descrito en, por ejemplo, las patentes de E.U.A. Nos. 5580560, 6017882, 6693075, 6762286 y 6806063, publicaciones de patentes de E.U.A. Nos. 20030100506 y

87

20040220106 y publicaciones de patente internacionales Nos. WO1988010295, WO200183725, WO2003093465, WO200338162, WO2004083361, WO2004108763, WO2004029090, WO2004029091, WO2004111242 y WO2005123916.

Como se usa en este documento, "polipéptidos modificados del factor VII" y "factor VII modificado" se refiere a un polipéptido FVII que tiene una o más diferencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido no modificado del factor VII. La una o más diferencias de aminoácidos pueden ser mutaciones de aminoácidos tales como uno o más reemplazos de aminoácidos (sustituciones), inserciones o eliminaciones, o pueden ser inserciones o eliminaciones de dominios completos, y algunas combinaciones de los mismos. Típicamente, un polipéptido FVII modificado tiene una o más modificaciones en la secuencia primaria en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado aquí proporcionado puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más diferencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Está contemplada cualquier modificación con tal de que el polipéptido resultantes muestre al menos una actividad FVII con un polipéptido FVII nativo, tal como, por ejemplo, actividad catalítica, actividad proteolítica, la capacidad de enlazar a TF o la capacidad de enlazar plaquetas activadas.

Como se usa en este documento, "inhibidores de coagulación" se refieren a proteínas o moléculas que actúan para inhibir o evitar la coagulación o formación de coágulos. La inhibición o prevención de la coagulación se puede observar

000058

in vivo o in vitro, y se puede ensayar al usar cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero no limitado a, ensayo de tiempo de protromboplastina (PT) o el ensayo activado parcial de tiempo de protromboplastina (aPTT).

Como se usa en este documento, inhibidor de la trayectoria del factor de tejido (TFPI, también referido como TFPI-1) es un inhibidor del tipo Kunitz que está involucrado en la formación de un complejo inhibidor cuaternario TF/FVIIa/TFPI/FXa en el cual se inhibe la actividad de FVIIa. TFPI se expresa como dos diferentes formas precursoras que siguen al empalme alternativo, precursores TFPIα (SEQ ID NO:75) y TFPIβ (SEQ ID NO:77), los cuales se escinden durante la secreción para generar una proteína madura de 276 aminoácidos (SEQ ID NO:76) y una de 223 aminoácidos (SEQ ID NO:78), respectivamente. TFPI contiene 3 dominios Kunitz, de los cuales el dominio Kunitz-1 es responsable del enlace e inhibición de FVIIa.

Como se usa en este documento, TFPI-2 (también conocida como proteína 5 de placenta (PP5) e inhibidor de serina proteasa asociado con matriz (MSPI)) se refiere a un homólogo de TFPI. La proteína madura TFPI-2 de 213 aminoácidos (SEQ ID NO: 79) contiene tres dominios del tipo Kunitz que muestran un 43%, 35% y 53% de identidad de secuencias primaria con los dominios 1, 2 y 3 del tipo Kunitz del TFPI-I, respectivamente. TFPI-2 juega un papel en la regulación de la digestión y remodelado de la matriz extracelular, y no se cree que sea un factor importante en la trayectoria de coagulación.

Como se usa en este documento, antitrombina III (AT-III) es un inhibidor de serina proteasa (serpina). AT-III se

000059

sintetiza como una proteína precursora que contiene 464 residuos de aminoácidos (SEQ ID NO:95) que se escinden durante la secreción para liberar una antitrombina madura de 432 aminoácidos (SEQ ID NO:96).

Como se usan en la presente, cofactores se refieren a proteínas o moléculas que se enlazan a otras proteínas o moléculas específicas para formar un complejo activo. En algunos ejemplos, se requiere el enlace a un cofactor para actividad proteolítica óptima. Por ejemplo, el factor de tejido (TF) es un cofactor de FVIIa. El enlace de FVIIa a TF induce cambios conformacionales que resultan en actividad proteolítica incrementada de FVIIa para sus substratos, FX y FIX.

Como se usa en este documento, factor de tejido (TF) se refiere a una glicoproteína de transmembrana de 263 aminoácidos (SEQ ID NO:97) que funciona como un cofactor para FVIIa. Se expresa constitutivamente por las células del músculo liso y los fibroblastos, y ayuda a iniciar la coagulación al enlazar FVII y FVIIa cuando estas células entran en contacto con el torrente sanguíneo después de una lesión de tejidos.

Como se usa en este documento, plaqueta activada se refiere a una plaqueta que se ha disparado por el enlace de moléculas tales como colágeno, tromboxano A2, ADP y trombina para sufrir diversos cambios en la morfología, fenotipo y función que finalmente promueven la coagulación. Por ejemplo, una plaqueta activada cambia en forma a una más amorfa con extremos que se proyectan. Las plaquetas activadas también padecen una "aleta" de la membrana celular tal que la fosfatidilserina y otros fosfolípidos cargados negativamente

90

que están normalmente presentes en la cubierta interior de la membrana celular, se transubican hacia la superficie exterior orientada al plasma. Estas membranas de las plaquetas activadas proporcionan la superficie sobre la cual se efectúan muchas de las reacciones de la cascada de coagulación. Las plaquetas activadas también segregan vesículas que contienen tales factores pro-coagulantes como vWF, FV, trombina, ADP y tromboxano A2, y se adhieren una con la otra para formar un tapón de plaquetas el cual se estabiliza por fibrina para convertirse en un coágulo.

Como se usa en este documento, enlace y/o afinidad incrementada para plaquetas activadas, y cualesquiera variaciones gramaticales de lo mismo, se refiere a una capacidad potenciada de un polipéptido o proteína, por ejemplo un polipéptido FVII, para enlazar a la superficie de una plaqueta activada, en comparación con un polipéptido o proteína de referencia. Por ejemplo, la capacidad de un polipéptido FVII modificado para enlazar a plaquetas activadas puede ser mayor que la capacidad del polipéptido FVII no modificado para enlazar a plaquetas activadas. El enlace y/o afinidad de un polipéptido para plaquetas activadas puede incrementarse por al menos alrededor de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en comparación con el enlace y/o afinidad de un polipéptido no modificado. Los ensayos para determinar el enlace y/o afinidad de un polipéptido para plaquetas activadas se conocen en la técnica. El enlace de un polipéptido FVII a plaquetas activadas está mediado a través de la interacción de

91

aminoácidos en el dominio Gla del polipéptido FVII y fosfolípidos cargados negativamente, tales como fosfatidilserina, sobre la plaqueta activada. Como tal, los métodos para ensayar el enlace de polipéptidos, tales como los polipéptidos FVII, a plaquetas activadas usa membranas y vesículas que contienen fosfolípidos, tales como fosfatidilserina. Por ejemplo, la capacidad de un polipéptido para enlazarse a una plaqueta activada se refleja por la capacidad del polipéptido para enlazar a vesículas de fosfolípidos, lo cual puede medirse por técnicas de dispersión de luz.

Como se usa en este documento, enlace y/o afinidad incrementada para fosfolípidos, y cualesquiera variaciones gramaticales de lo mismo, se refiere a una capacidad potenciada de un polipéptido o proteína para enlazar a fosfolípidos en comparación con un polipéptido o proteína de referencia. Los fosfolípidos pueden incluir cualesquiera fosfolípidos, pero incluyen particularmente fosfatidilserina. El enlace y/o afinidad de un polipéptido para fosfolípidos puede incrementarse por al menos alrededor de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en comparación con el enlace y/o afinidad de un polipéptido no modificado. Los ensayos para determinar la afinidad y/o enlace de un polipéptido a fosfolípidos se conocen en la técnica. Por ejemplo, el enlace del polipéptido FVII a vesículas de fosfolípidos puede ser determinado por dispersión relativa de luz a 90° a la luz incidente. La intensidad de la dispersión de luz con las

92

vesículas de fosfolípidos solas y con vesículas de fosfolípidos con FVII se mide para determiner la constante de disociación. La resonancia de plasma en superficie, tal como en un instrument biosensor BIAcore, también puede ser usada para medir la afinidad de los polipéptidos FVII para membranas de fosfolípidos.

Como se usa en este documento, resistencia incrementada a inhibidores o "resistencia incrementada a AT-III" o "resistencia incrementada a TFPI" se refiere a cualquier cantidad de sensibilidad disminuida de un polipéptido a los efectos inhibidores de un inhibidor, tal como AT-III o TFPI, en comparación con un polipéptido de referencia, tal como un polipéptido FVII no modificado. La resistencia incrementada a un inhibidor, tal como AT-III, puede ser ensayada al evaluar el enlace de un polipéptido FVII modificado a un inhibidor. La resistencia incrementada a un inhibidor, tal como AT-III, también puede ser ensayada al medir la actividad intrínseca o actividad coagulante de un polipéptido FVII en la presencia de AT-III. Los ensayos para determinar el enlace de un polipéptido a un inhibidor se conocen en la técnica. Para inhibidores covalentes, tal como, por ejemplo, AT-III, una constante de velocidad de segundo orden para inhibición puede ser medida. Para inhibidores no covalentes, tal como, por ejemplo, TFPI, una k_i puede ser medida. Además, la resonancia de superficie en plasma, tal como sobre un instrumento biosensor BIAcore, también puede ser usada para medir el enlace de los polipéptidos FVII a AT-III u otros inhibidores. Sin embargo, para los inhibidores covalentes tales como AT-III, solamente

93

una velocidad activa puede ser medida usando BIAcore. Los ensayos para determinar el efecto inhibidor de, por ejemplo, AT-III sobre la actividad coagulante o actividad intrínseca de FVII también se conocen en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de un polipéptido FVII modificado para escindir su sustrato FX en la presencia o ausencia de AT-III puede ser medida, y el grado al cual AT-III inhibe la reacción determinada. Esto puede ser en comparación con la capacidad de un polipéptido FVII no modificado para escindir su sustrato FX en la presencia o ausencia de AT-III. Un polipéptido modificado que muestra resistencia incrementada a un inhibidor muestra, por ejemplo, un incremento de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más resistencia a los efectos de un inhibidor en comparación con un polipéptido no modificado.

Como se usa en este documento, "resistencia incrementada a inhibición por Zn^{2+}," "resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+}" o "resistencia incrementada a Zn^{2+}" se refiere a cualquier cantidad de sensibilidad disminuida de un polipéptido para los efectos inhibidores de Zn^{2+} en comparación con un polipéptido de referencia, tal como un polipéptido FVII no modificado. La resistencia incrementada a Zn^{2+} se puede ensayar mediante, por ejemplo, medir la actividad intrínseca o actividad coagulante de un polipéptido FVII en la presencia de Zn, tal como se describe en el Ejemplo 11. La resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+} puede ser el resultado de un enlace disminuido a Zn^{2+}. El enlace disminuido a

94

Zn^{2+} puede ser ensayado al medir la cantidad de Zn^{2+} enlazado por molécula de FVIIa o al medir la afinidad del enlace de Zn^{2+} a FVIIa o al medir un IC_{50} para inhibición de una actividad FVIIa por zinc. Un polipéptido modificado que muestra resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+} muestra, por ejemplo, un incremento de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más resistencia a los efectos de Zn^{2+} en comparación con un polipéptido no modificado.

Como se usa en este documento, una secuencia de enlace a la albúmina de suero se refiere a una secuencia de residuos de aminoácidos que pueden efectuar enlace a albúmina de suero. Así, cuando se inserta dentro de un polipéptido FVII, la secuencia de enlace a la albúmina de suero puede potenciar la afinidad para o el enlace a albúmina de suero del polipéptido FVII. La capacidad del polipéptido FVII modificado que contienen la secuencia de enlace a la albúmina de suero puede por lo tanto mostrar un enlace y/o afinidad incrementado para albúmina de suero. Un polipéptido modificado que muestra enlace y/o afinidad incrementado para albúmina de suero muestra, por ejemplo, un incremento de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en comparación con el enlace y/o afinidad de un polipéptido no modificado. Típicamente, las secuencias de enlace a la albúmina de suero contienen al menos 10 o más aminoácidos, típicamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40 o más

95

aminoácidos. Ejemplos de las secuencias de enlace a la albúmina de suero son aquellas establecidas en SEQ ID NOS:103-109.

Como se usa en este documento, una secuencia de enlace a integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ se refiere a una secuencia de residuos de aminoácidos que puede efectuar el enlace a la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$. Así, cuando se inserta dentro de un polipéptido FVII, la secuencia de enlace a la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ puede potenciar la capacidad del polipéptido FVII para enlazar a la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ y, por lo tanto, plaquetas, incluyendo plaquetas activadas. La capacidad del polipéptido FVII modificado que contiene la secuencia de enlace de integrina de plaquetas $\alpha\pi_b\beta_3$ puede por lo tanto mostrar enlace y/o afinidad incrementado para integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ y/o plaquetas. Un polipéptido modificado que muestra enlace y/o afinidad incrementado para integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ muestra, por ejemplo, un incremento de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en comparación con el enlace y/o afinidad de un polipéptido no modificado. Típicamente, las secuencias de enlace a integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ contienen al menos 5 o más aminoácidos, típicamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40 o más aminoácidos. Ejemplos de las secuencias de enlace de la integrina de plaquetas $\alpha\pi_b\beta_3$ son aquellos establecidos en SEQ ID NOS: 110-112.

Como se usa en este documento, un sitio de glicosilación se refiere a una posición amino en un polipéptido al cual puede unirse una porción de carbohidratos. Típicamente, una proteína

96

glicosilada contiene uno o más residuos de aminoácidos, tal como asparagina o serina, para la unión a las porciones de carbohidratos.

Como se usa en este documento, un sitio de glicosilación nativo se refiere a una posición amino a la cual una porción de carbohidratos se une en un polipéptido de tipo silvestre. Existen cuatro sitios de glicosilación nativos en FVII; dos sitios de N-glicosilación en N145 y N322, y dos sitios de O-glicosilación en S52 y S60, que corresponden a posiciones de aminoácidos en el polipéptido maduro FVII establecido en SEQ ID NO:3.

Como se usa en este documento, un sitio de glicosilación no nativo se refiere a una posición amino a la cual una porción de carbohidratos se une en un polipéptido modificado que no está presente en un polipéptido de tipo silvestre. Los sitios de glicosilación no nativos pueden ser introducidos dentro de un polipéptido FVII por reemplazo de aminoácidos. Los sitios de O-glicosilación pueden ser creados, por ejemplo, por reemplazo de aminoácidos de un residuo nativo con una serina o treonina. Los sitios de N-glicosilación puede ser creados, por ejemplo, al establecer la porción Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, donde Xaa no es prolina. La creación de esta secuencia de consenso por la modificación de aminoácidos puede involucrar, por ejemplo, un reemplazo de aminoácidos sencillo de un residuo de aminoácidos nativo con una asparagina, un reemplazo de aminoácidos sencillo de un residuo de aminoácidos nativo con una serina, treonina o cisteína, o un reemplazo de aminoácidos doble que involucra un primer reemplazo de aminoácidos de un residuo nativo con una

97

asparagina y un segundo reemplazo de aminoácidos de residuo nativo con una serina, treonina o cisteína.

Como se usa en este documento, "actividad biológica" se refiere a las actividades in vivo de un compuesto o respuestas fisiológicas que resultan con la administración in vivo de un compuesto, composición u otra mezcla. Actividad biológica, así, abarca efectos terapéuticos y actividad farmacéutica de tales compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden observarse en sistemas in vitro diseñados para probar o usar tales actividades. Así, para los propósitos en la presente una actividad biológica de un polipéptido FVII abarca la actividad coagulante.

Como se usa en este documento el término "evaluar" y variaciones gramaticales del mismo, se pretende para incluir determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto por la actividad de un polipéptido, y también de obtener un índice, relación, porcentaje, valor visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la detección de escisión de un sustrato por un polipéptido puede ser por medición directa del producto, o puede ser medido indirectamente al determinar la actividad resultante del sustrato escindido.

Como se usa en este documento, "numeración de quimiotripsina" se refiere a la numeración de aminoácidos de un polipéptido maduro de quimiotripsina de SEQ ID NO: 80. La alineación de un dominio de proteasa de otra proteasa, tal como por ejemplo el dominio de proteasa del factor VII, puede ser

98

hecha con quimiotripsina. En tal caso, los aminoácidos de factor VII que corresponden a los aminoácidos de quimiotripsina se les da la numeración de los aminoácidos de quimiotripsina. Las posiciones correspondientes pueden ser determinadas por tal alineación por alguien experto en la técnica al usar alineaciones manuales o al usar los diversos programas de alineación disponibles (por ejemplo, BLASTP). Las posiciones correspondientes también se pueden basar en alineaciones estructurales, por ejemplo al usar alineaciones simuladas por computadora de estructura de proteínas. La mención de que los aminoácidos de un polipéptido corresponden a los aminoácidos en una secuencia descrita se refieren a aminoácidos identificados con la alineación del polipéptido con la secuencia descrita para maximizar la identidad u homología (donde se alinean los aminoácidos conservados) al usar un algoritmo de alineación estándar, tal como el algoritmo GAP. Los números correspondientes de quimiotripsina de posiciones de aminoácidos 1 a 406 del polipéptido FVII establecido en SEQ ID NO:3 se suministran en la Tabla 1. Las posiciones de aminoácidos relativas a la secuencia establecida en SEQ ID NO:3 están en fuente normal, los residuos de aminoácidos en esas posiciones están en negritas, y los números correspondientes de quimiotripsina están en cursivas. Por ejemplo, con la alineación del factor VII maduro (SEQ ID NO:3) con la quimiotripsina madura (SEQ ID NO:80), la isoleucina (I) en la posición de aminoácidos 153 en el factor VII se da la numeración de quimiotripsina de I16. Los aminoácidos posteriores se enumeran consecuentemente. En un ejemplo, un

99

ácido glutámico (E) en la posición de aminoácidos 210 del factor VII maduro (SEQ ID NO:3) corresponde a la posición E70 de aminoácidos con base en la numeración de quimiotripsina. Donde existe un residuo en una proteasa, pero no está presente en la quimiotripsina, al residuo de aminoácidos se le da una notación de letra. Por ejemplo, los residuos en la quimiotripsina que son parte de un rizo con el aminoácido 60 con base en la numeración de quimiotripsina, pero se insertan en la secuencia del factor VII en comparación con la quimiotripsina, se refieren como por ejemplo K60a, I60b, K60c o N60d. Estos residuos corresponden a K197, I198, K199 y N200, respectivamente, por numeración relativa a la secuencia madura del factor VII (SEQ ID NO:3).

Tabla 1. Numeración de quimiotripsina del factor VII

153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167
I	V	G	G	K	V	C	P	K	G	E	C	P	W	Q
16	*17*	*18*	*19*	*20*	*21*	*22*	*23*	*24*	*25*	*26*	*27*	*28*	*29*	*30*
168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182
V	L	L	L	V	N	G	A	Q	L	C	G	G	T	L
31	*32*	*33*	*34*	*35*	*37*	*38*	*39*	*40*	*41*	*42*	*43*	*44*	*45*	*46*
183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
I	N	T	I	W	V	V	S	A	A	H	C	F	D	K
47	*48*	*49*	*50*	*51*	*52*	*53*	*54*	*55*	*56*	*57*	*58*	*59*	*60*	*60A*
198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212

100

I	K	N	W	R	N	L	I	A	V	L	G	E	H	D
60B	*60C*	*60D*	*61*	*62*	*63*	*64*	*65*	*66*	*67*	*68*	*69*	*70*	*71*	*72*

213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227
L	S	E	H	D	G	D	E	Q	S	R	R	V	A	Q
73	*74*	*75*	*76*	*77*	*78*	*79*	*80*	*81*	*82*	*83*	*84*	*85*	*86*	*87*

228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242
V	I	I	P	S	T	Y	V	P	G	T	T	N	H	D
88	*89*	*90*	*91*	*92*	*93*	*94*	*95*	*96*	*97*	*98*	*99*	*100*	*101*	*102*

243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257
I	A	L	L	R	L	H	Q	P	V	V	L	T	D	H
103	*104*	*105*	*106*	*107*	*108*	*109*	*110*	*111*	*112*	*113*	*114*	*115*	*116*	*117*

258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272
V	V	P	L	C	L	P	E	R	T	F	S	E	R	T
118	*119*	*120*	*121*	*122*	*123*	*124*	*125*	*126*	*127*	*128*	*129*	*129A*	*129B*	*129C*

273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287
L	A	F	V	R	F	S	L	V	S	G	W	G	Q	L
129D	*129E*	*129F*	*129G*	*134*	*135*	*136*	*137*	*138*	*139*	*140*	*141*	*142*	*143*	*144*

288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302
L	D	R	G	A	T	A	L	E	L	M	V	L	N	V
145	*146*	*147*	*149*	*150*	*151*	*152*	*153*	*154*	*155*	*156*	*157*	*158*	*159*	*160*

303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317
P	R	L	M	T	Q	D	C	L	Q	Q	S	R	K	V
161	*162*	*163*	*164*	*165*	*166*	*167*	*168*	*169*	*170*	*170A*	*170B*	*170C*	*170D*	*170E*

318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332
G	D	S	P	N	I	T	E	Y	M	F	C	A	G	Y
170F	*170G*	*170H*	*170I*	*175*	*176*	*177*	*178*	*179*	*180*	*181*	*182*	*183*	*184A*	*184*

333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347
S	D	G	S	K	D	S	C	K	G	D	S	G	G	P
185	*186*	*187*	*188A*	*188*	*189*	*190*	*191*	*192*	*193*	*194*	*195*	*196*	*197*	*198*

348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362
H	A	T	H	Y	R	G	T	W	Y	L	T	G	I	V
199	*200*	*201*	*202*	*203*	*204*	*205*	*206*	*207*	*208*	*209*	*210*	*211*	*212*	*213*

101

363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377
S	W	G	Q	G	C	A	T	V	G	H	F	G	V	Y
214	*215*	*216*	*217*	*219*	*220*	*221A*	*221*	*222*	*223*	*224*	*225*	*226*	*227*	*228*

378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392
T	R	V	S	Q	Y	I	E	W	L	Q	K	L	M	R
229	*230*	*231*	*232*	*233*	*234*	*235*	*236*	*237*	*238*	*239*	*240*	*241*	*242*	*243*

393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	
S	E	P	R	P	G	V	L	L	R	A	P	F	P	
244	*245*	*246*	*247*	*248*	*249*	*250*	*251*	*252*	*253*	*254*	*255*	*256*	*257*	

Como se usa en este documento, ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo ácidos nucleicos de péptidos (PNA) y mezclas de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Cuando se refiere a sonda o cebadores, que están opcionalmente etiquetados, tales como con una etiqueta detectable, tal como una fluorescente o radioetiqueta, se contemplan moléculas monocatenarias. Tales moléculas son típicamente de una longitud tal que su objetivo es estadísticamente único o de un número de baja copia (típicamente menos de 5, generalmente menos de 3) para la formación de sondas o de cebadores en una colección. Generalmente una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de complementariedad de secuencia para, o idénticos para un gen de interés. Las sondas y cebadores pueden ser de 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de largo.

Como se usa en este documento, un péptido se refiere a un polipéptido que tiene desde 2 hasta 40 aminoácidos de largo.

Como se usa en este documento, los aminoácidos que se presentan en las diversas secuencias de aminoácidos aquí proporcionadas se identifican de acuerdo con sus abreviaturas conocidas de tres letras o de una letra (Tabla 2). Los

102

nucleótidos que se presentan en los diversos fragmentos de ácidos nucleicos se designan con las designaciones estándar de una letra usadas de rutina en la técnica.

Como se usa en este documento, un "aminoácido" es un compuesto orgánico que contiene un grupo aminoácido y un grupo ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para los propósitos en la presente, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos que se presentan naturalmente, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en donde el carbono α tiene una cadena lateral).

De acuerdo con la nomenclatura estándar de polipéptidos descrita en *J. Biol. Chem.*, 243: 3552-3559 (1969), y adoptada por 37 C.F.R, §§ 1.821-1.822, las abreviaturas para los residuos de aminoácidos se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2 - Tabla de Correspondencia

SIMBOLO		
1-Letra	**3-Letras**	**AMINOACIDO**
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina

103

E	Glu	Ácido glutámico
Z	Glx	Gly y/o Gln
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Ácido aspártico
N	Asn	Asparaginas
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otros

Se debe observar que todas las secuencias de residuos de aminoácidos representadas en este documento por las fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional del amino-terminal a carboxilo-terminal. Además, la frase "residuo de aminoácidos" se define ampliamente para incluir los aminoácidos listados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 2) y aminoácidos modificados e inusuales, tales como aquellos referidos en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, e incorporados en este documento a manera de referencia. Adicionalmente, se debe observar que un guión al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace de péptido a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos, a un grupo amino-terminal tal como NH_2 o a un grupo carboxilo-terminal tal como COOH.

Como se usa en este documento, un "aminoácido hidrofóbico" incluye cualquiera de los aminoácidos determinados que sean hidrofóbicos usando la escala consenso de hidrofobicidad de Eisenberg. Son ejemplares los aminoácidos hidrofóbicos de origen natural, tales como isoleucina, fenilalanina, valina, leucina, triptófano, metionina, alanina, glicina, cisteína y tirosina (Eisenberg *y colaboradores*, (1982) Faraday Symp. Chem. Soc. 17:109- 120). También se incluyen aminoácidos hidrofóbicos

no de origen natural.

Como se usa en este documento, un "aminoácido ácido" incluye entre los aminoácidos de origen natural residuos de ácido aspártico y ácido glutámico. También se incluyen aminoácidos ácidos no de origen natural.

Como se usa en este documento, "aminoácidos de origen natural" se refiere a los 20 L-aminoácidos que ocurren en los polipéptidos.

Como se usa en este documento, "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico que no es uno de los aminoácidos de origen natural listados en la Tabla 2. Los aminoácidos no de origen natural incluyen de esta manera, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos diferentes a los 20 aminoácidos no de origen natural e incluyen, pero no se limitan a, los D-isostereómeros de aminoácidos. Los aminoácidos no naturales ejemplares son conocidos por aquellas personas expertas en el campo y se pueden incluir en un polipéptido de factor VII modificado.

Como se usa en este documento, un constructo de ADN es una molécula de ADN lineal o circular, de hebra individual o doble hebra que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera no encontrada en la naturaleza. Los constructos de ADN existen como un resultado de la manipulación humana, e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

Como se usa en este documento, un segmento de ADN es una porción de una molécula de ADN más grande que tiene atributos especificados. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un

polipéptido especificado es una porción de una molécula de ADN más larga, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, el cual, cuando se lee de la dirección 5′ a 3′, codifica las secuencias de aminoácidos del polipéptido especificado.

Como se usa en este documento, el término polinucleótido propone un polímero de hebra individual o doble hebra de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídos del extremo 5′ al 3′. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar de fuentes naturales, sintetizadas *in vitro*, o preparadas a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula de polinucleótido se proporciona en este documento en términos de nucleótidos (abreviado "nt") o pares base (abreviados "bp"). El término nucleótidos se usa para moléculas de hebra individual y doble hebra donde el contexto lo permita. Cuando el término se aplica a moléculas de doble hebra se usa para indicar la longitud total y se entenderá que es equivalente al término pares base. Se reconocerá por aquellas personas expertas en el campo que las dos hebras de un polinucleótido de doble hebra pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos de las mismas se pueden escalonar; de esta manera todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido de doble hebra no se puede parear. Estos extremos no pareados, en general, no excederán 20 nucleótidos en longitud.

Como se usa en este documento, "secuencia primaria" se refiere a la secuencia de residuos de aminoácido en un polipéptido.

Como se usa en este documento, "similitud" entre dos

proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud se puede basar en el grado de identidad y/u homología de las secuencias de residuos y los residuos contenidos en las mismas. Los métodos para estimar el grado de similitud entre las proteínas o ácidos nucleicos son bien conocidos por aquellas personas expertas en el campo. Por ejemplo, en un método para estimar la similitud de secuencia, dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se alinean de una manera que produzca un niel máximo de identidad entre las secuencias. "identidad" se refiere al grado al cual las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son invariantes. La alineación de la secuencia de aminoácidos, y algún grado de secuencias de nucleótidos, también pueden tomar en cuenta diferencias conservadoras y/o sustituciones frecuentes en los aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservadoras son aquellas que conservan las propiedades fisicoquímicas de los residuos implicados. Las alineaciones pueden ser globales (alineación de las secuencias comparadas sobre la longitud total de las secuencias e incluyen todos los residuos) o locales (la alineación de una porción de secuencia que incluye únicamente la región o regiones más similares).

Como se usa en este documento, los términos "homología" e "identidad" se usan intercambiablemente, pero la homología de las proteínas puede incluir cambios de aminoácidos conservadores. En general para identificar las posiciones correspondientes las secuencias de aminoácidos se alinean para

107

que el igualamiento de primer orden se obtenga (véase, *por ejemplo*: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data. Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carillo *y colaboradores* (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073).

Como se usa en este documento, "identidad de secuencia" se refiere al número de aminoácidos idénticos (o bases de nucleótidos) en una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de prueba y de referencia. Polipéptidos homólogos se refiere a una variedad predeterminada de residuos de aminoácidos idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones de aminoácidos conservadores como también residuos idénticos. La identidad de secuencia se puede determinar mediante programas de algoritmo de alineación estándar usados con penalizaciones de espacio por omisión establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico homólogas se refieren a una variedad predeterminada de nucleótidos idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones que no cambian el aminoácido codificado (*es decir*, "sustituciones silenciosas") así como también residuos idénticos. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas se hibridan típicamente en rigor moderado o en alto

000078

rigor todas a lo largo de la longitud del ácido nucleico o a lo largo de por lo menos aproximadamente 70%, 80% o 90% de la molécula de ácido nucleico de longitud completa de interés. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contiene codones degenerados en lugar de codones en la hibridación de la molécula de ácido nucleico. (Para la determinación de la homología de las proteínas, se pueden alinear aminoácidos conservadores así como también aminoácidos idénticos; en este caso, el porcentaje de identidad y el porcentaje de homología varían). Si cualquiera de dos moléculas de ácido nucleico tienen secuencias de nucleótidos (o cualquiera de los dos polipéptidos tienen secuencias de aminoácidos) que son por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% "idénticos" se puede determinar usando algoritmos de computadora conocidos tal como el programa "FAST A", que usa por ejemplo, los parámetros por omisión como en Pearson *y colaboradores Proc. Natl. Acad. Sci. EUS* 85: 2444 (1988) (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., *y colaboradores, Nucleic Acids Research* 12(I): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., *y colaboradores, J. Molec. Biol.* 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994), y Carillo y colaboradores *SIAM J Applied Math* 48: 1073 (1988)). Por ejemplo, la función BLAST de la base de datos Información del Centro Nacional para Biotecnología se puede usar para determinar la identidad. Otros programas comercialmente o públicamente disponibles incluyen el programa DNAStar "MegAlign" (Madison, WI) y el programa "Gap" del Grupo de Computadora de Genética de la Universidad de Wisconsin (UWG)

000079

(Madison WI)). El porcentaje de homología o identidad de las proteínas y/o las moléculas de ácido nucleico se puede determinar, por ejemplo, al comparar la formación de secuencia que usa un programa de computadora GAP (*por ejemplo*, Needleman *y colaboradores J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), como se revisó por Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)). Brevemente, un programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (*es decir*, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, divididos por el número total de símbolos en lo más corto de las dos secuencias. Los parámetros por omisión para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación pesadas de Gribskov *y colaboradores Nucl. Acids Res.* 14: 6745 (1986), como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, páginas 353-358 (1979); (2) una penalización de 3.0 para cada espacio y una penalización de 0.10 adicional para cada símbolo en cada espacio; y (3) sin penalización para los espacios de extremo.

Por lo tanto, como se usa en este documento, el término "identidad" representa una comparación entre una prueba y un polipéptido o polinucleótido de referencia. En un ejemplo no limitante, "por lo menos 90% idéntico a" se refiere al porcentaje de identidades de 90 a 100% relativos con los polipéptidos de referencia. La identidad en un niel de 90% o más es indicativo del hecho de que, asumiendo para propósitos de ejemplificación se compara una longitud de polinucleótido de

710

prueba de referencia de 100 aminoácidos, no más de 10% (*es decir*, 10 de 100) de aminoácidos en el polipéptido de prueba difiere de aquel de los polipéptidos de referencia. Se pueden hacer comparaciones similares entre unos polinucleótidos de prueba y de referencia. Estas diferencias se pueden representar como mutaciones puntuales distribuidas aleatoriamente sobre la longitud completa de una secuencia de aminoácidos o se pueden agrupar en una o más ubicaciones de longitud variante hasta el máximo permisible, *por ejemplo*, 10/100 diferencias de aminoácidos (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones y supresiones de ácidos nucleicos o aminoácidos. En el nivel de las homologías o identidades anteriores aproximadamente 85-90%, el resultado debe ser independiente del programa y los ajustes de los parámetros de espacio; estos niveles de identidad se pueden estimar fácilmente, sin depender frecuentemente de un software.

Como se usa en este documento, también se entiende que los términos "sustancialmente idéntico" o "similar" varían con el contexto como es entendido por aquellas personas expertas en el campo relevante, pero que aquellas personas de experiencia pueden estimar.

Como se usa en este documento, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similitud y/o identidad) para alinear posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Típicamente, se alinean dos o más secuencias que se relacionan por 50% o más de identidad. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias que se alinean en posiciones correspondientes y pueden incluir

111

secuencias de alineación derivadas de ARNs, tales como ESTs y otros ADNAcs, alineados con la secuencia de ADN genómico.

Como se usa en este documento, "hibridiza específicamente" se refiere a la combinación de pares de bases, mediante apareamiento de bases complementario, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo un oligonucleótido) a una molécula de ácido nucleico objetivo. Aquellas personas expertas en el campo están familiarizados con los parámetros *in vitro* e *in vivo* que afectan la hibridación específica, tal como longitud y composición de la molécula particular. Los parámetros pertinentes particularmente con la hibridación *in vitro* incluyen además temperaturas de combinación de pares de bases y de lavado, composición amortiguadora y concentración de sal. Las condiciones de lavado ejemplares para remover moléculas de ácido nucleico no específicamente enlazadas en alto rigor son 0.1 x SSPE, 0.1% de SDS, 65°C, y en rigor medios son 0.2 x SSPE, 0.1% de SDS, 50°C. Son conocidas en el campo las condiciones rigurosas equivalentes. La persona experta puede ajustar fácilmente estos parámetros para lograr la hibridación específica de una molécula de ácido nucleico a una molécula de ácido nucleico objetivo apropiada para una aplicación particular.

Como se usa en este documento, polipéptido o proteína aislada o purificada o porción biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula del tejido de la cual la proteína se deriva, o sustancialmente libre de los precursores químicos u otros químicos cuando se sintetizan químicamente.

Las preparaciones se pueden determinar para estar sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables como se determina por los métodos estándares de análisis, tal como cromatografía de capa delgada (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), usadas por aquellas personas expertas en el campo para estimar esta pureza, o sustancialmente pura tal que la purificación adicional no alteraría detectablemente las propiedades físicas y químicas, tales como actividades proteolíticas y biológicas, de la sustancia. Los métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos de manera sustancial químicamente puros son conocidos por aquellas personas de experiencia en el campo. Un compuesto de manera sustancial químicamente puro, sin embargo, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En estos casos, la purificación adicional podría incrementar la actividad específica del compuesto.

El término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las cuales la proteína se separa de los componentes celulares de las células de las cuales se aísla o produce recombinantemente. En una modalidad, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas de proteasa que tienen menor que aproximadamente 30% (en peso seco) de proteínas no de proteasa (también referidas en este documento como una proteína contaminante), generalmente aproximadamente 20% no de proteasa o 10% no de proteasa o menor que aproximadamente 5% de proteínas no de proteasa. Cuando la proteína de proteasa o porción activa de la misma se produce recombinantemente,

000083

también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menor que, aproximadamente, o igual a 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína de proteasa.

Como se usa en este documento, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos incluye preparaciones de proteínas de proteasa en las cuales la proteína se separa de los precursores químicos u otros químicos que se implican en la síntesis de la proteína. El término incluye preparaciones de proteínas de proteasa que tienen menor que aproximadamente 30% (en peso seco), 20%, 10%, 5% o menor de precursores químicos o químicos o componentes no de proteasa.

Como se usa en este documento, la producción mediante métodos recombinantes al usar métodos de ADN recombinante se refiere al uso de los métodos bien conocidos de la biología molecular para expresar proteínas codificadas por el ADN clonado.

Como se usa en este documento, vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se usan para introducir ácido nucleico heterólogo en las células para ya sea la expresión o replicación de la misma. Los vectores permanecen típicamente episomales, pero se pueden diseñar para efectuar la integración de un gen o porción del mismo dentro de un cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamífero. La selección y uso de estos vehículos son bien conocidos por aquellas personas de experiencia en el campo.

114

Como se usa en este documento, expresión se refiere al proceso por el cual el ácido nucleico se transcribe dentro del ARNm y se traduce en péptidos, polipéptidos, o proteínas. Si el ácido nucleico se deriva de ADN genómico, la expresión puede, si una célula hospedera eucariótica apropiada u organismo se selecciona, incluyen procesamiento, tal como empalme del ARNm.

Como se usa en este documento, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que se enlaza operativamente con las secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de estos fragmentos de ADN. Estos fragmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y pueden incluir opcionalmente uno o más orígenes de aplicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación y los similares. Los vectores de expresión se derivan generalmente de ADN plásmido o viral, o puede contener elementos de ambos. De esta manera, un vector de expresión se refiere a un constructo de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otro vector que, en la introducción en una célula hospedera apropiada, da por resultado la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por aquellas personas expertas en el campo e incluyen a aquellos que son replicables en células eucarióticas y/o o células procarióticas y aquellos que permanecen episomales o aquellos que se integran dentro del genoma de la célula hospedera.

Como se usa en este documento, el vector también incluye "vectores de virus" o "vectores virales". Los vectores virales

000085

son virus diseñados que se enlazan operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o lanzaderas) los genes exógenos dentro de las células.

Como se usa en este documento, un adenovirus se refiere a cualquiera de un grupo de virus que contienen ADN que causan conjuntivitis e infecciones del tracto respiratorio superior en humanos.

Como se usa en este documento, ADN desnudo se refiere a ADN sin histonas que se pueden usar para vacunas y terapia génica. El ADN desnudo es el material genético que se hace pasar de célula a célula durante una transferencia de genes procesada llamada transformación o transfección. En la transformación o transfección, el ADN purificado o desnudo que es captado por la célula recipiente proporcionará a la célula recipiente una nueva característica o fenotipo.

Como se usa en este documento, operable u operativamente enlazado cuando se refiere a segmentos de ADN propone que los segmentos sean arreglados para que funcionen conjuntamente con sus propósitos intencionados, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y continúa a través del segmento de codificación al terminador.

Como se usa en este documento, un agente que modula la actividad de una proteína o expresión de un gen o ácido nucleico ya sea disminuye o incrementa o de otra manera altera la actividad de la proteína o, de alguna manera regula por incremento o decremento o altera de otra manera la expresión del ácido nucleico en una célula.

Como se usa en este documento, una "proteína quimérica" o

"proteína de fusión" se refiere a un polipéptido enlazado operativamente a un polipéptido diferente. Una proteína quimérica o de fusión proporcionada en este documento puede incluir uno o más polipéptidos FVII, o una porción de los mismos, y uno o más de otros polipéptidos para cualquiera o más de unas señales de control transcripcionales/traduccionales, secuencias de señal, una etiqueta para localización, una etiqueta para purificación, parte de un dominio de una inmunoglobulina G, y/o un agente objetivo. Un polipéptido FVII quimérico también incluye aquellos que tienen sus dominios o regiones endógenas del polipéptido intercambiado con otro polipéptido. Estas proteínas quiméricas o de fusión incluyen aquellas producidas por medios recombinantes como proteínas de fusión, aquellas producidas por medios químicos, tal como mediante acoplamiento químico, a través, por ejemplo, del acoplamiento de grupos de sulfhidrilo, y aquellos producidos por cualquier otro método mediante el cual por lo menos un polipéptido (*es decir* FVII), o una porción del mismo, se enlaza, directa o indirectamente por la vía de enlazador(es) a otro polipéptido.

Como se usa en este documento, enlazado operativamente cuando se refiere a una proteína de fusión se refiere a un polipéptido proteasa y un polipéptido no de proteasa que se fusionan dentro del marco entre sí. El polipéptido no de proteasa se puede fusionar a la N-término o C-término del polipéptido proteasa.

Como se usa en este documento, un agente objetivo, es cualquier porción, tal como una proteína o porción efectiva de

000087

la misma, que proporciona enlace específico a una molécula de la superficie celular, tal como un receptor de superficie celular, el cual en algunos casos puede interiorizar un conjugado enlazado o porción del mismo. Un agente objetivo también puede ser uno que promueve o facilita, por ejemplo, el aislamiento o purificación de afinidad del conjugado; unión del conjugado a una superficie; o detección del conjugado o complejos que contienen el conjugado.

Como se usa en este documento, derivado o análogo de una molécula se refiere a una porción derivada de o una versión modificada de la molécula.

Como se usa en este documento, "enfermedad o trastorno" se refiere a una condición patológica en un organismo que resulta de la causa o condición que incluye, pero no se limita a, infecciones, condiciones adquiridas, condiciones genéticas, y se caracteriza por síntomas identificables. Las enfermedades y trastornos de interés en este documento son aquellos que implican coagulación, que incluyen aquellas mediadas por proteínas de coagulación y aquellas en las cuales las proteínas de coagulación desempeñan una función en la etiología o patología. Enfermedades y trastornos también incluyen aquellos que son causados por la ausencia de una proteína tal como en la hemofilia, y de interés particular en este documento son aquellos trastornos donde la coagulación no ocurre debido a una deficiencia de defecto en una proteína de coagulación.

Como se usa en este documento, "procoagulante" se refiere a cualquiera sustancia que promueve la coagulación de la sangre.

000088

Como se usa en este documento, "anticoagulante" se refiere a cualquier sustancia que inhibe la coagulación de la sangre.

Como se usa en este documento, "hemofilia" se refiere a un trastorno de sangrado causado por una deficiencia en unos factores de coagulación de la sangre. La hemofilia puede ser el resultado, por ejemplo, de ausencia, expresión reducida o función reducida de un factor de coagulación. El tipo más común de hemofilia es hemofilia A, la cual resulta de una deficiencia en el factor VIII. El segundo tipo más común de hemofilia es la hemofilia B, la cual resulta de una deficiencia en el factor IX. La hemofilia C, también llamada deficiencia en FXI, es una forma más leve y menos común de hemofilia.

Como se usa en este documento, "hemofilia congénita" se refiere a tipos de hemofilia que son heredados. La hemofilia congénita resulta de la mutación, supresión, inserción u otra modificación de un gen de factor de coagulación en el cual la producción del factor de coagulación está ausente, reducida, o no funcional. Por ejemplo, las mutaciones hereditarias en los genes del factor de coagulación, tal como factor VIII y factor IX dan por resultado las hemofilias congénitas, Hemofilia A y Hemofilia B, respectivamente.

Como se usa en este documento, "hemofilia adquirida" se refiere a un tipo de hemofilia que se desarrolla en la edad adulta de la producción de anticuerpos que inactivan el FVIII.

Como se usa en este documento, "trastorno hemorrágico" se refiere a una condición en el cual el sujeto tiene una capacidad disminuida de controlar el sangrado. Los trastornos de sangrado se pueden heredar o adquirir, y pueden resultar de,

000089

por ejemplo, defectos o deficiencias en la vía de coagulación, defectos o deficiencias en actividad de plaquetas o defectos vasculares.

Como se usa en este documento, "trastorno hemorrágico adquirido" se refiere a trastornos de sangrado que resultan de deficiencias de coagulación causadas por condiciones tal como enfermedad del hígado, deficiencia de vitamina K, o terapia con coumadina (warfarina) u otro anti-coagulante.

Como se usa en este documento, "tratar" un sujeto que tiene una enfermedad o condición propone que un polipéptido, composición u otro producto proporcionado en este documento se administre al sujeto.

Como se usa en este documento, un agente terapéutico, régimen terapéutico, radioprotector o quimioterapéutico propone fármacos convencionales y terapias con fármacos que incluyen vacunas, los cuales son conocidos por aquellas personas expertas en el campo. Los agentes radioterapéuticos son bien conocidos en el campo.

Como se usa en este documento, tratamiento propone cualquier manera en la cual los síntomas de una condición, trastorno o enfermedad se mejoran o de otra manera se alteran beneficamente. Por consiguiente el tratamiento abarca profilaxis, terapia y/o cura. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de las composiciones en este documento. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de un FVII modificado y composiciones proporcionadas en este documento.

Como se usa en este documento, mejoramiento de los

síntomas de una enfermedad o trastorno particular por un tratamiento, tal como mediante la administración de una composición farmacéutica u otro agente terapéutico, se refiere a cualquiera que disminuya, ya sea permanente o temporal, de larga duración o transiente, de los síntomas que se pueden atribuir a o asociar con la administración de la composición o agente terapéutico.

Como se usa en este documento, la prevención o profilaxis se refiere a métodos en los cuales el riesgo de desarrollar enfermedad o condición se reduce. La profilaxis incluye reducción en el riesgo de desarrollar una enfermedad o condición y/o una prevención de empeoramiento de los síntomas o progresión de una enfermedad o reducción en el riesgo de empeoramiento de los síntomas o progresión de una enfermedad.

Como se usa en este documento una cantidad efectiva de un compuesto o composición para tratar una enfermedad particular es una cantidad que es suficiente para mejorar, o de alguna manera reducir los síntomas asociados con la enfermedad. Esta cantidad se puede administrar como una sola dosis o se puede administrar de acuerdo con un régimen, mediante el cual es efectivo. La cantidad puede curar la enfermedad, pero típicamente, se administra a fin de mejorar los síntomas de la enfermedad. Típicamente, la administración repetida es requerida para lograr un mejoramiento deseado de los síntomas.

Como se usa en este documento, "cantidad terapéuticamente efectiva" o "dosis terapéuticamente efectiva" se refiere a un agente, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que es por lo menos suficiente para producir un

efecto terapéutico. Una cantidad efectiva es la cantidad de un agente terapéutico necesario para prevenir, curar, mejorar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

Como se usa en este documento, "paciente" o "sujeto" que se trata incluye humanos y o animales no humanos, que incluyen mamíferos. Los mamíferos incluyen primates, tales como humanos, chimpancés, gorilas y monos; animales domesticados, tales como perros, caballos, gatos, cerdos, cabras, vacas; y roedores tales como ratones, ratas, hámster y jerbos.

Como se usa en este documento, una combinación se refiere a cualquiera asociación entre dos o entre más artículos. La asociación puede ser espacial o referirse al uso de dos o más artículos para un propósito común.

Como se usa en este documento, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos o compuestos (por ejemplo, agentes, moduladores, reguladores, etcétera). Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, o una pasta, formulaciones acuosas o no acuosas o cualquier combinación de las mismas.

Como se usa en este documento, un "artículo de manufactura" es un producto que se hace y se vende. Como se usa por toda esta solicitud, el término se propone para abarcar polipéptidos de proteasa modificados y ácidos nucleicos contenidos en artículos de empaque.

Como se usa en este documento, fluido se refiere a cualquier composición que puede fluir. Los fluidos abarcan de esta manera composiciones que están en la forma de semisólidos,

pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras de estas composiciones.

Como se usa en este documento, un "kit" se refiere a una combinación empaquetada, que incluye opcionalmente reactivos y otros productos y/o componentes para practicar los métodos usando los elementos de la combinación. Por ejemplo, se proporcionan kits que contienen un polipéptido modificado o molécula de ácido nucleico proporcionados en este documento y otro artículo para un propósito que incluye, pero no se limita a, administración, diagnóstico, y estimación de una actividad o propiedad biológica. Los kits incluyen opcionalmente instrucciones para el uso.

Como se usa en este documento, el anticuerpo incluye fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab, los cuales se componen de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada.

Como se usa en este documento, un receptor se refiere a una molécula que tiene una afinidad para un ligando particular. Los receptores pueden ser moléculas de origen natural o sintéticas. Los receptores también se pueden referir en el campo como anti-ligandos.

Como se usa en este documento, animal incluye cualquier animal, tal como, pero no se limita a; primates que incluyen humanos, gorilas y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves de corral, tales como gallinas; rumiantes, tales como cabras, vacas, venados, ovejas; ovinos, tales como cerdos y otros animales. Animales no humanos excluyen humanos como el animal contemplado. Las proteasas proporcionadas en este

123

documento provienen de cualquier fuente, animal, vegetal, procariótica y fúngica.

Como se usa en este documento, la terapia génica implica la transferencia de ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, dentro de ciertas células, células objetivo, de un mamífero, particularmente un humano, con un trastorno o condición para la cual se busca esta terapia. El ácido nucleico, tal como ADN, se introduce en las células objetivo seleccionadas, tal como directamente o en un vector u otro vehículo de suministro, de una manera tal que el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, se expresa y un producto terapéutico codificado en consecuencia se produce. Alterativamente, el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, puede de alguna manera mediar la expresión del ADN que codifica el producto terapéutico, o puede codificar un producto, tal como un péptido o ARN que de alguna manera media, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. La terapia genética también se usa para suministrar ácido nucleico que codifica un producto génico que reemplaza un gen defectuoso o suplementar un producto génico producido por el mamífero o la célula en la cual se introduce. El ácido nucleico introducido puede codificar un compuesto terapéutico, tal como una proteasa o proteasa modificada, que no se produce normalmente en el hospedero mamífero o que no se produce en cantidades terapéuticamente efectivas o en un tiempo terapéuticamente útil. El ácido nucleico heterólogo, tal como ADN que codifica el producto terapéutico se puede modificar antes de la introducción en las células del hospedero afectado a fin de mejorar o de otra manera alterar el producto o

121

expresión del mismo. La terapia genética también puede implicar el suministro de un inhibidor o represor u otro modulador de la expresión génica.

Como se usa en este documento, ácido nucleico heterólogo es ácido nucleico que no se produce normalmente in vivo por las célula en la cual se expresa o que se produce por la célula pero está en un sitio diferente o se expresa diferentemente o que media o codifica los mediadores que alteran la expresión del ácido nucleico endógeno, tal como ADN, al afectar la transcripción, traducción, u otros procesos bioquímicos regulables. El ácido nucleico heterólogo no es generalmente endógeno a la célula en la cual se introduce, sino se ha obtenido de otra célula o se ha preparado sintéticamente. El ácido nucleico heterólogo puede ser endógeno, pero es ácido nucleico que se expresa de un sitio diferente o se altera en su expresión. Generalmente, aunque no necesariamente, este ácido codifica el ARN y las proteínas que no se producen normalmente por la célula o de la misma forma en la célula en la cual se expresa. El ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, también se puede referir como ácido nucleico extraño, tal como ADN. De esta manera, el ácido nucleico heterólogo o ácido nucleico extraño incluye una molécula de ácido nucleico no presente en la orientación o posición exacta como la contraparte de la molécula de ácido nucleico tal como ADN, se encuentra en un genoma. También puede referirse a una molécula de ácido nucleico de otro organismo o especie (*es decir*, exógena).

Cualquier ácido nucleico, tal como ADN, y que una persona experta en el campo reconocería o consideraría heterólogo o

extraño a la célula en la cual el ácido nucleico se expresa se abarca en este documento por ácido nucleico heterólogo; el ácido nucleico heterólogo incluye ácido nucleico exógenamente agregado que también se expresa endógenamente. Ejemplos de ácido nucleico heterólogo incluyen, pero no se limitan a, ácido nucleico que codifica proteínas marcadoras rastreables, tal como una proteína que confiere resistencia a fármacos, ácido nucleico que codifica sustancias terapéuticamente efectivas, tales como agentes anticáncer, enzimas y hormonas y ácido nucleico tal como ADN, que codifica otros tipos de proteínas, tales como anticuerpos. Los anticuerpos que se codifican por el ácido nucleico heterólogo se pueden secretar o expresar sobre la superficie de la célula en la cual se ha introducido el ácido nucleico heterólogo.

Como se usa en este documento, un producto terapéuticamente efectivo para la terapia génica es un producto que se codifica por el ácido nucleico heterólogo, típicamente ADN, que, en la introducción del ácido nucleico en un hospedero, se expresa un producto que mejora o elimina los síntomas, manifestaciones de una enfermedad heredada o adquirida que cura la enfermedad. También se incluyen moléculas de ácido nucleico biológicamente activas, tal como ARNi de antisentido.

Como se usa en este documento, la citación de que un polipéptido "consiste esencialmente" de una secuencia citada de aminoácidos propone que únicamente la porción citada, o un fragmento de la misma, del polipéptido de longitud completa este presente. El polipéptido puede opcionalmente y podrá

126

generalmente, incluir aminoácidos adicionales de otra fuente o se puede insertar en otro polipéptido.

Como es usa en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera. De esta manera, por ejemplo, la referencia a compuesto, que comprende "un dominio extracelular" incluye compuestos con una o una pluralidad de dominios extracelulares.

Como se usa en este documento, intervalos y cantidades es pueden expresar como "aproximadamente" un valor o intervalo particular. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por consiguiente "aproximadamente 5 bases" propone "aproximadamente 5 bases" y también "5 bases."

Como se usa en este documento, "opcional" u "opcionalmente" propone que el evento o circunstancia subsecuentemente descritos ocurra o no y que la descripción incluye casos donde el evento o circunstancia ocurre en casos donde no. por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido propone que el grupo sea insustituido o sea sustituido.

Como se usa en este documento, las abreviaturas para cualquiera de los grupos protectores, aminoácidos y otros compuestos, están, a menos que se indique de otra manera, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas, o la Nomenclatura de la Comisión en la Bioquímica IUPAC-IUB (véase, (1972) Biochem. 11: 1726).

B. Descripción General de la Hemostasis

Se proporcionan en este documento polipéptidos de Factor VII (FVII) modificados. Estos polipéptidos FVII se diseñan para

129

tener actividad coagulante incrementada. Por consiguiente, estos polipéptidos tienen una variedad de usos y aplicaciones, por ejemplo, como agentes terapéuticos para modular la hemostasis, y otros procesos biológicos relacionados. Para apreciar las modificaciones proporcionadas en este documento y el uso de estas moléculas FVII modificadas, es ventajoso un entendimiento del sistema hemostático y la cascada de coagulación de la sangre. El siguiente planteamiento proporciona este antecedente, preliminar a un planteamiento del factor VII, y modificaciones de los mismos.

La hemostasis es el mecanismo fisiológico que surge a raíz del sangrado que resulta de una lesión a la vasculatura. La hemostasis normal depende de componentes celulares y proteínas plasmáticas solubles, e implica una serie de eventos de señalización que conduce finalmente a la formación de un coágulo sanguíneo. La coagulación se inicia rápidamente después de que ocurre una lesión al vaso sanguíneo y se dañan las células endoteliales. En la primera fase de la coagulación, las plaquetas se activan para formar un tapón hemostático en el sitio de la lesión. La hemostasis secundaria sigue implicando los factores de coagulación plasmáticos, los cuales actúan en una cascada proteolítica que da por resultado la formación de hebras de fibrina las cuales fortalecen el tapón de plaquetas.

En la lesión del vaso, el flujo sanguíneo al área lesionada inmediata se restringe por la constricción vascular permitiendo que las plaquetas se adhieran al colágeno fibrilar recientemente expuesto sobre el tejido conjuntivo sub-endotelial. Esta lesión es dependiente del factor von

128

Willebrand (vWF), el cual se enlaza al endotelio dentro de tres segundos de la lesión, facilitando en consecuencia la adhesión y la agregación de las plaquetas. La activación de las plaquetas agregadas da por resultado la secreción de una variedad de factores, que incluyen ADP, ATP, tromboxano y serotonina. Las moléculas de adhesión, fibrinógeno, vWF, trombospondina y fibronectina también se liberan. Esta secreción promueve la adhesión y agregación adicional de las plaquetas, la activación de las plaquetas incrementada y la constricción del vaso sanguíneo, y la exposición de fosfolípidos aniónicos sobre la superficie de la plaqueta que sirve como plataformas para un ensamble de los complejos de enzimas de coagulación de la sangre. Las plaquetas cambian de forma conduciendo a la formación pseudópoda, la cual facilita además la agregación a otras plaquetas que dan por resultado un tapón de plaquetas suelto.

Una cascada de coagulación de peptidasas (la cascada de coagulación) se inicia simultáneamente. La cascada de coagulación implica una serie de eventos de activación que implican la escisión proteolítica. En esta cascada una proteína inactiva de una serina proteasa (también llamada un zimógeno) se convierte a una proteasa activa mediante la escisión de uno o más enlaces de péptido, los cuales luego sirven como la proteasa de activación para la siguiente molécula zimógeno en la cascada, dando por resultado finalmente la formación del coágulo por la reticulación de la fibrina. Por ejemplo, la cascada genera moléculas activadas tal como trombina (de la escisión de la protrombina), la cual activa además las

129

plaquetas, y también genera la fibrina de la escisión del fibrinógeno. La fibrina luego forma un polímero reticulado alrededor del tapón de plaquetas para estabilizar el coágulo. En la reparación de la lesión, la fibrina se digiere por el sistema fibrinolítico, los componentes principales de los cuales son el plasminógeno y el activador de plasminógeno de tipo de tejido (tPA). Ambas de estas proteínas se incorporan en la polimerización de la fibrina, donde interactúan para generar la plasmina, la cual, a su vez, actúa sobre la fibrina para disolver el coágulo preformado. Durante la formación del coágulo, los inhibidores del factor de coagulación también circulan a través de la sangre para evitar la formación de coágulo más allá del sitio de la lesión.

La interacción del sistema, desde la lesión hasta la formación del coágulo y la fibrinólisis subsecuente, se describe a continuación.

1. Adhesión y Agregación de Plaquetas

La coagulación de la sangre se evita activamente bajo condiciones normales. El endotelio vascular soporta la vasodilatación, inhibe la adhesión y activación de las plaquetas, suprime la coagulación, mejora la escisión de la fibrina y es antiinflamatorio en naturaleza. Las células endoteliales vasculares secretan moléculas tales como óxido nitroso (NO) y prostacilina, las cuales inhiben la agregación de plaquetas y dilatan los vasos sanguíneos. La liberación de estas moléculas activa las guanilato-ciclasas solubles (sGC) y proteína cinasa I (cGKI) dependiente de cGMP e incrementa los niveles del monofosfato de guanosina cíclica (cGMP), los cuales

130

causan la relajación del músculo liso en la pared del vaso. Adicionalmente, las células endoteliales expresan ADPasas de la superficie celular, tal como CD39, las cuales controlan la activación y agregación de las plaquetas al convertir la ADP liberada de las plaquetas en inhibidores de plaqueta de nucleótidos de adenina. El endotelio también desempeña una función importante en la regulación de las enzimas en la cascada fibrinolítica. Las células endoteliales promueven directamente la generación de plasmina a través de la expresión de los receptores del plasminógeno (anexina II) y urocinasa, así como también la secreción de los activadores de plasminógeno de tipo de tejido y urocinasa, todos de los cuales promueven la eliminación de coágulos. En una capa final de la regulación protrombótica, las células endoteliales desempeñan una función activa en inhibir la cascada de coagulación al producir sulfato de heparano, el cual incrementa la cinética de la inhibición de la antitrombina III de la trombina y otros factores de coagulación.

Bajo trauma vascular agudo, sin embargo, los mecanismos vasoconstrictores predominan y el endotelio es protrombótico, procoagulante y pro-inflamatorio en naturaleza. Esto se logra por una reducción de agentes de dilatación endoteliales: adenosina, NO y prostaciclina; y la acción directa del ADP, serotonina y tromboxano sobre las células del músculo liso vascular para inducir su contracción (Becker, Heindl *y colaboradores* 2000). El desencadenador principal para el cambio en la función endotelial que conduce a la formación de trombo hemostático es la pérdida de la barrera celular endotelial

131

entre los componentes de matriz sanguínea y extracelular (ECM) (Ruggeri (2002) Nat Med 8:1227-1234). Las plaquetas circulantes se identifican y discriminan áreas de lesiones endoteliales y se adhieren al sub endotelio expuesto. Su interacción con los diversos substratos trombogénicos y los agonistas generados o liberados localmente da por resultado la activación de las plaquetas. Este proceso se describe por poseer dos etapas, 1) adhesión: el anclaje inicial a una superficie, y 2) agregación: cohesión plaqueta-plaqueta (Savage *y colaboradores* (2001) Curr Opin Hematol 8:270-276).

La adhesión de las plaquetas se inicia cuando las plaquetas circulantes se enlazan al colágeno expuesto a través de la interacción con las proteínas de enlace de colágeno sobre la superficie celular, y a través de la interacción con vWF, también presente sobre el endotelio, la proteína vWF es una estructura multimérica de tamaño variable, secretada en dos direcciones por el endotelio; basolateralmente y dentro de la corriente sanguínea. El vWF también se enlaza al factor VIII, el cual es importante en la estabilización del factor VIII y su supervivencia en la circulación.

La adhesión y activación subsecuente de las plaquetas se logra cuando el vWF se enlaza por la vía de su dominio A1 a GPIb (parte del complejo receptor de glicoproteína de plaquetas GPIb-IX-V). La interacción entre vWF y GPIb se regula por una fuerza cortante tal que un incremento en la tensión de esfuerzo cortante da por resultado un incremento correspondiente en la afinidad de vWF para GPIb. La integrina $\alpha 1\beta 2$, también conocida sobre los leucocitos como VLA-2, es el receptor de colágeno

132

principal sobre las plaquetas, y el acoplamiento a través de este receptor genera las señales intracelulares que contribuyen a la activación de las plaquetas. El enlace a través del α1β2 facilita el acoplamiento del receptor de colágeno de afinidad más baja, GP VI. Esto es parte de la superfamilia de inmunoglobulinas y es el receptor de genera las señales intracelulares más potentes para la activación de las plaquetas. La activación de las plaquetas da por resultado la liberación de difosfato de adenosina (ADP), el cual se convierte a tromboxano A2.

La activación de las plaquetas también da por resultado la expresión superficial de los receptores de glicoproteína IIb-IIIa (GP IIb-IIIa) de plaquetas, también conocidos como $\alpha_{II}\beta_3$ integrina. Los receptores GP IIb-IIIa permiten la adherencia de las plaquetas entre sí (*es decir* agregación) en virtud de las moléculas de fibrinógeno que se enlazan a las plaquetas a través de estos receptores. Esto da por resultado la formación de un tapón de plaquetas en el sitio de la lesión para ayudar a prevenir la pérdida de sangre adicional, mientras que el tejido vascular dañado libera factores que inician la cascada de coagulación y la formación de una malla de fibrina estabilizante alrededor del tapón de plaquetas.

2. Cascada de coagulación

La trayectoria de coagulación es una trayectoria proteolítica donde cada enzima está presente en el plasma como un zimógeno, o forma inactiva. La escisión del zimógeno se regula para liberar la forma activa de la molécula precursora. Los cofactores de las proteasas activadas, tales como las

glicoproteínas FVIII y FV, también es activan en la reacción de cascada y desempeñan una función en la formación del coágulo. La trayectoria funciona como una serie de bucles de retroalimentación positiva y negativa los cuales controlan el proceso de activación, donde la meta final es producir trombina, la cual luego puede convertir el fibrinógeno soluble en fibrina para formar un coágulo. Los factores en la coagulación se proporcionan típicamente como un número numérico romano, con una minúscula "a" anexada para indicar una forma activada. La Tabla 3 a continuación expone una lista ejemplar de los factores, que incluyen su nombre común, y su función en la cascada de coagulación. Generalmente estas proteínas participan en la coagulación de la sangre a través de una o más de las vías intrínsecas, e extrínsecas o comunes de coagulación (véase la Figure 1). Como se plantea posteriormente, estas vías se interconectan, y la coagulación de la sangre que cree que ocurren a través de un modelo basado en células de la activación en el Factor VII (FVII) que es el iniciador primario de la coagulación.

Tabla 3

Factores de Coagulación

Factor	Nombre Común	Vía	Característica
I	Fibrinógeno	Ambas	-
II	Protrombina	Ambas	Contiene el dominio Gla N-terminal
III	Factor de tejido	Extrínseca	-
IV	Calcio	Ambas	-
V	Proacelerina, factor lábil, globulina Aceleradora	Ambas	Cofactor de proteína

VI (Va)	Acelerina	-	(Redundante al factor V)
VII	Proconvertina, acelerador de conversión de protrombina de suero (SPCA) cotromboplastina	Extrínseca	Endopeptidasa con dominio Gla
VIII	Factor A antihemofiliaco, globulina antihemofiliaca (AHG)	Intrínseca	Cofactor de proteína
IX	Factor navidad, factor B, antihemofiliaco, componente de tromboplastina en plasma (PTC)	Intrínseca	Endopeptidasa con el dominio Gla
X	Factor de potencia Stuart	Ambas	Endopeptidasa con domino Gla
XI	Antecedente de tromboplastina en plasma (PTA)	Intrínseca	Endopeptidasa
XII	Factor de Hageman	Intrínseca	Endopeptidasa
XIII	Protransglutamidasa, factor estabilizador de fibrina (FSF), fibrinoligasa	Ambas	Transpeptidasa

* Tabla adaptada de M.W. King (2006) en med.unibs.it/~marchesi/blood.html

La generación de la trombina se ha dividido históricamente en tres trayectorias, la trayectoria intrínseca (se sugiere que todos los componentes de la trayectoria son intrínsecos al plasma) y extrínseca (que sugiere que uno o más componentes de la trayectoria sean extrínsecos al plasma) que proporcionan rutas alternativas para la generación del factor X activado (FXa), y la trayectoria común final la cual da por resultado la

135

formación de trombina (Figura 1). Estas trayectorias participan conjuntamente en un proceso interconectado e interdependiente para afectar la coagulación. Se desarrolló un modelo de coagulación basado en células que describe estas vías (Figura 2) (Hoffman *y colaboradores* (2001) Thromb Haemost 85:958- 965). En este modelo, las trayectorias "extrínsecas" e "intrínsecas" se efectúan sobre diferentes superficies celulares, la célula que lleva el factor de tejido (TF) y la plaqueta, respectivamente. El proceso de coagulación se separa en fases distintas, iniciación, amplificación y propagación, durante lo cual las trayectorias extrínsecas e intrínsecas funcionan en varias etapas para producir la gran explosión de trombina requerida para convertir cantidades suficientes de fibrinógeno a fibrina para la formación del coágulo.

a. Inicio

El FVII se considera que es el factor de coagulación responsable para la iniciación de la cascada de coagulación, lo cual la iniciación es dependiente de su interacción con el TF. El TF es una glicoproteína de transmembrana expresada por una variedad de células tales como células del músculo liso, fibroblastos, monocitos, linfocitos, granulocitos, plaquetas y células endoteliales. Las células mieloides y las células endoteliales expresan únicamente TF cuando se estimulan, tal como mediante citocinas pro-inflamatorias. Las células del músculo liso y fibroblastos, sin embargo, expresan TF constitutivamente. Por consiguiente, una vez que estas células entran en contacto con la corriente sanguínea después de la lesión del tejido, la cascada de coagulación se inicia

136

rápidamente por el enlace del TF con el factor VII o FVIIa en el plasma.

Como se plantea posteriormente, la mayoría de FVII en la sangre está en la forma de zimógeno con una pequeña cantidad, aproximadamente 1%, presente como FVIIa. En la ausencia del enlace de TF, sin embargo, aún FVIIa tiene características similares a zimógeno y no muestra actividad significativa hasta que se forma en complejo con TF. De esta manera, el FVII plasmático requiere activación por la escisión proteolítica, y el cambio conformacional adicional a través de la interacción con TF, para la actividad completa. Una gama de proteasas, que incluyen factores IXa, Xa, XIIa, y trombina, se han mostrado que son capaces de la escisión de FVII *in vitro*, un proceso el cual se acelera en presencia del TF. El FVIIa por sí mismo, también puede activar FVII en presencia de TF, un proceso llamado autoactivación. Las pequeñas cantidades de FVIIa en la sangre son probablemente debido a la activación por FXa y/o FIXa (Wildgoose *y colaboradores* (1992) Blood 80:25-28, y Butenas *y colaboradores* (1996) Biochemistry 35:1904-1910). Los complejos TF/FVIIa se pueden formar de esta manera por el enlace directo de FVIIa a TF, o por el enlace de FVII a TF y luego la activación subsecuente de a FVII a FVIIa por una proteasa plasmática, tal como FXa, FIXa, FXIIa, o FVIIa misma. El complejo TF/FVIIa permanece anclado a la célula que lleva TF donde activa pequeñas cantidades de FX en FXa en lo que es conocido como la "trayectoria extrínseca" de la coagulación.

El complejo TF/FVIIa también escinde pequeñas cantidades de FIX en FIXa. El FXa se asocia con su cofactor FVa también

137

para formar un complejo sobre la célula que lleva TF que luego puede convertir la protrombina a trombina. La pequeña cantidad de trombina producida es, sin embargo, inadecuada para soportar la formación de fibrina requerida para completar la coagulación. Adicionalmente, cualquier FXa e FIXa activo se inhiben en la circulación por la antitrombina III (AT-III) y otras serpinas, las cuales se plantean con más detalle posteriormente. Esto evitaría normalmente la formación de coágulos en la circulación. En presencia de una lesión, sin embargo, el daño a la vasculatura da por resultado la agregación y activación de plaquetas en este sitio de formación de trombina, permitiendo en consecuencia la amplificación de la señal de coagulación.

b. Amplificación

La amplificación tiene lugar cuando la trombina se enlaza a y activa las plaquetas. Las plaquetas activadas liberan FV de sus gránulos alfa, los cuales se activan por la trombina a FVa. La trombina también libera y activa FVIII del complejo FVIII/vWF sobre la membrana de las plaquetas, y escinde, FXI en FXIa. Estas reacciones generan plaquetas activadas que tienen FVa, FVIIIa y FIXa sobre su superficie, lo cual ajusta la etapa para una gran explosión de generación de trombina durante la etapa de propagación.

c. Propagación

La propagación de la coagulación ocurre sobre la superficie de grandes números de plaquetas en el sitio de la lesión. Como se describe anteriormente, las plaquetas activadas tienen FXIa, FVIIIa y FVa sobre su superficie. En este punto es

que la vía extrínseca se efectúa. El FXIa activa FIX a FIXa, el cual luego se puede enlazar con FVIIIa. Este proceso, además de las pequeñas cantidades de FIXa que se genera por la escisión de FIX por el complejo TF/FVIIa sobre la célula que lleva TF, genera grandes números de complejos FXIa/FVIIIa los cuales a su vez pueden activar cantidades significativas de FX a FXa. Las moléculas de FXa se enlazan a FVa para generar los complejos de protrombinasa que activan la protrombina a trombina. La trombina actúa en un circuito de retroalimentación positiva para activar incluso más las plaquetas y nuevamente inicia los procesos descritos para la fase de amplificación.

Dentro de poco tiempo, existen suficientes números de plaquetas activadas con los complejos apropiados para generar la explosión de trombina que es suficientemente grande para generar suficientes cantidades de trombina de fibrinógeno para formar un coágulo de fibrina hemostática. El fibrinógeno es un dímero soluble en plasma el cual, cuando se escinde por la trombina libera fibrinopéptido A y fibrinopéptido B. el fibrinopéptido B luego se escinde por la trombina, y los monómeros de fibrina formados por esta segunda escisión proteolítica forma espontáneamente un gel insoluble. La fibrina polimerizada se mantiene junta por fuerzas no covalentes y electrostáticas y se estabiliza por el factor XIIIa (FXIIIa), de factor de enzima de transamidación, producido por la escisión de FXIII por la trombina. La trombina también activa TAFI, el cual inhibe la fibrinólisis al reducir la generación de plasmina en la superficie del coágulo. Adicionalmente, la trombina misma se incorpora dentro de la estructura del coágulo

000109

para estabilización adicional. Estos agregados (coágulos) de fibrina insoluble, conjuntamente con las plaquetas (trombos) agregados, bloquean el vaso sanguíneo dañado y evitan el sangrado adicional.

3. Regulación de la Coagulación

Durante la coagulación, la cascada se regula por procesos constitutivos y estimulados para inhibir la formulación adicional de coágulos. Existen varias razones para tales mecanismos reguladores. Primero, la regulación es requerida para limitar la isquemia de los tejidos por la formación de coágulos de fibrina. Segundo, la regulación evita la trombosis extendida al localizar la formación de coágulos únicamente en el sitio de la lesión del tejido.

La regulación se logra por los cationes de varias moléculas inhibidoras. Por ejemplo, la antitrombina III (AT-III) y el inhibidor de la vía del factor de tejido (TFPI) trabajan constitutivamente para inhibir los factores en la cascada de coagulación. El AT-III inhibe la trombina, FIXa, y FXa, mientras que el TFPI inhibe FXa y el complejo FVIIa/TF. Un factor adicional, Proteína C, la cual se estimula por la vía de la activación de plaquetas, regula la coagulación por la escisión proteolítica y la inactivación de FVa y FVIIIa. La Proteína S mejora la actividad de la Proteína C. Además, otro factor que contribuye a la inhibición de la coagulación es la trombomodulina proteínica de membrana integral, la cual se produce por células endoteliales vasculares y sirve como un receptor para la trombina. El enlace de trombina a la trombomodulina inhibe las actividades procoagulantes de la

140

trombina y también contribuye a la activación de la proteína C.

La fibrinólisis, la ruptura del coágulo de fibrina, también proporciona un mecanismo para regular la coagulación. Los multímeros de fibrina reticulados en un coágulo se rompen a polipéptidos solubles por la plasmina, una serina proteasa. La plasmina se puede generar de su plasminógeno precursor inactivo y reclutarse al sitio de un coágulo de fibrina en dos formas: mediante la interacción con el activador de plasminógeno de tejido (tPA) en la superficie de un coágulo de fibrina, y mediante la interacción con el activador de plasminógeno de urocinasa (uPA) en una superficie celular. El primer mecanismo parece que es el principal responsable para la disolución de los coágulos dentro de los vasos sanguíneos. El segundo, aunque capaz de mediar la disolución del coágulo, puede desempeñar una función principal en la remodelación del tejido, migración de células y la inflamación.

La disolución del coágulo también se regula en dos formas. Primera, la activación eficiente de la plasmina y la fibrinólisis ocurren únicamente en complejos formados en la superficie del coágulo o sobre una membrana celular, mientras que las proteínas libre en las sangre son catalizadores ineficientes y se inactivan rápidamente. Segunda, los activadores de plasminógeno y la plasmina se inactivan por las moléculas tal como inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1) y PAI-2 los cuales actúan sobre los activadores de plasminógeno, y α2-antiplasmina y α2-macroglobulina que inactivan la plasmina. Bajo circunstancias normales, el balance oportuno entre la coagulación y la fibrinólisis da por

141

resultado la formación eficiente y eliminación de coágulos después de la lesión vascular, mientras que previene simultáneamente episodios trombóticos co-hemorrágicos no deseados.

Una breve descripción de los factores de coagulación ejemplares, cofactores y proteínas reguladoras, y sus actividades, se exponen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Zimógenos del Factor de Coagulación y Cofactores

Nombre del Factor	Actividad
Zimógenos de Serina Proteasa	
Factor XII	Enlaces de colágeno expuestos en el sitio de la lesión de la pared del vaso, activados por quininógeno con alta MW y calicreína
Factor XI	Activada por el factor XIIa
Factor IX	Activada por el factor XIa + Ca^{2+}
Factor VII	Activada por la trombina, factor X, factor IXa o factor XIIa + Ca^{2+}, o autoactivación
Factor X	Activada sobre la superficie de las plaquetas por el complejo de tenasa (FIXa/FVIIIa); También activada por el factor VIIa + factor de tejido + Ca^{2+}, o factor VIIa + Ca^{2+}
Factor II	Activada sobre la superficie de la plaquetas por el complejo de protrombinasa (FXa/FVa)
Cofactores	
Factor VIII	Activada por la protrombina; el factor VIIIa actúa como el cofactor para el factor IXa en la activación del factor X
Factor V	Activada por la trombina; el factor Va actúa como el cofactor para el

142

000112

	factor Xa en la activación de la protrombina
Factor III (Factor de tejido)	Actúa como el cofactor para el factor VIIa
Fibrinógeno	
Factor I (Fibrinógeno)	Escindido por la trombina para formar fibrina
Transglutaminasa	
Factor XIII	Activada por la trombina + Ca^{2+}; promueve la reticulación covalente de fibrina
Regulador y otras proteínas	
Factor von Willebrand (vWF)	Actúa como puente entre el complejo GPIb-V-IX y colágeno
Proteína C	Activada por la trombina enlazada a la trombomodulina; Ca degrada los factores VIIIA y Va
Proteína S	Actúa como factor de proteína C
Trombomodulina	Proteína de la superficie celular endotelial; enlaza la trombina, la cual activa la proteína C
Antitrombina III	Inhibidor de coagulación, principalmente de trombina y factor Xa, pero también los factores IXa, XIa, y XIIa, y el factor VIIa formados en complejo con TF
Inhibidor de la Vía del Factor de tejido (TFPI)	Enlaza FXa y luego forma una estructura cuaternaria con TF/FVIIa para inhibir la actividad TF/FVIIa

*Tabla adaptada de M.W.King (2006) med.unibs.it/~marchesi/blood.html

C. **Factor VII (FVII)**

El factor VII es una glicoproteína de la serina proteasa dependiente de vitamina K que se sintetiza en animales, que incluyen mamíferos, como un zimógeno de cadena individual en el hígado y secretada dentro de la corriente sanguínea. Como se describe anteriormente, el FVII es la proteasa de coagulación responsable para iniciar la cascada de eventos proteolíticos

143

que conducen a la generación de trombina y a la deposición de fibrina. Es parte de la vía extrínseca, aunque los efectos corriente abajo de su actividad también impartan grandemente sobre la vía intrínseca. Esta función integral en la formación de coágulos ha atraído el interés significativo en el FVII como un objetivo para las terapias anticoagulantes y hemostáticas clínicas. Por ejemplo, el FVII activado recombinante (rFVIIa) se ha desarrollado como un agente hemostático para el uso en sujetos hemofílicos, y sujetos con otras condiciones hemorrágicas. Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que se diseñan para tener actividad de coagulación incrementada en la activación, y que pueden servir como agentes terapéuticos mejorados para tratar enfermedades y condiciones susceptibles a la terapia con factor VII.

1. Estructura y organización del FVII

El gen FVII humano (F7) se localiza sobre el cromosoma 13 en 13q34 y es 12.8 kb de largo con 9 exones. El gen FVII comparte similitud de organización significativa con los genes que codifican otras proteínas dependientes de vitamina K, tal como protrombina, factor IX, factor X y proteína C. El ARNm para FVII se somete al empalme alternativo para producir dos transcriptos: variante 1 (No. de Acceso de Genbank NM_000131, expuesto en SEQ ID NO: 81) y variante 2 (No. de Acceso de Genbank NM 019616, expuesto en SEQ ID NO: 82). La variante de transcripción 2, la cual es la forma más abundante en el hígado, no incluye el exón 1b y de esta manera codifica un polipéptido precursor más corto de 444 aminoácidos (precursor b de isoforma FVII; SEQ ID NO:2), comparado con el polipéptido

000114

precursor de 466 aminoácido codificado por la variante de transcripción 1 (precursor a de isoforma FVII; SEQ ID NO:1). Los aminoácidos que no están presentes en el polipéptido precursor b de isoforma FVII corresponde a las posiciones de aminoácidos 22 a 43 del precursor a de isoforma FVII. Estos aminoácidos son parte de la secuencia de propéptidos, que dan por resultado el propéptido b de isoforma FVII truncado. Los polipéptidos precursores están constituidos de los siguientes segmentos y dominios: un péptido de señal hidrofóbico (aa 1-20 de SEQ ID NO:1 y 2), un propéptido (aa 21-60 de SEQ ID NO:1, y aa 21-38 de SEQ ID NO:2), un dominio Gla (aa 39-83 de SEQ ID NO:2, y aa 61-105 de SEQ ID NO: 1),un dominio de factor de crecimiento epidérmico de tipo B (1 similar a EGF, aa 84-120 de SEQ ID NO: 2, y aa 106-142 de SEQ ID NO: 1), un dominio del factor de crecimiento epidérmico de tipo A (2 similar a EGF, aa 125-166 de SEQ ID NO: 2; y aa 147-188 de SEQ ID NO: 1), y un dominio de adicciones serina proteasa (aa 191-430 de SEQ ID NO: 2, y aa 213-452 de SEQ ID NO: 1).

La forma madura de 406 aminoácidos del polipéptido FVII (SEQ ID NO: 3) carece de las secuencias de péptido y propéptido de señal, y es idéntica en la longitud y secuencia sin considerar el precursor de isoforma del cual se origina. En la forma madura del polipéptido FVII las posiciones de aminoácidos correspondientes para los dominios mencionados anteriormente son como sigue: dominio Gla (aa 1-45 de SEQ ID NO: 3), 1 similar a EGF (aa 46-82 de SEQ ID NO: 3), 2 similar a EGF (aa 87-128 de SEQ ID NO: 3), y dominio serina proteasa (aa 153-392 de SEQ ID NO: 3).

El dominio Gla de FVII es un motivo de enlace de membrana el cual, en la presencia de iones de calcio, interactúa con las membranas de fosfolípido que incluye fosfatidilserina. El dominio Gla también desempeña una función en el enlace al cofactor FVIIa, el factor de tejido (TF). Formado en complejo con TF, el dominio Gla de FVIIa se carga con siete iones Ca^{2+}, protege tres cadenas laterales hidrofóbicas en la dirección de la membrana celular para la interacción con los fosfolípidos sobre la superficie celular, y tiene contacto significativo con el domino C-terminal de TF. El domino Gla se conserva entre las proteínas dependientes de vitamina K, tal como protrombina, factores VII, IX y X de coagulación, proteínas C, S, y Z. Las proteínas requieren vitamina K para la síntesis postraduccional del ácido γ-carboxiglutámico, un aminoácido agrupado en el dominio Gla de N-terminal de estas proteínas. Todos los residuos glutámicos presentes en el dominio son sitios de carboxilación potenciales y muchos de ellos se modifican por lo tanto mediante la carboxilación.

Además del dominio Gla, la proteína FVII madura también contiene dos dominios similares a EGF. El primer dominio similar a EGF (1 similar a EGF 1 o EGF1) es un dominio EGF de enlace de calcio, en el cual seis cisteínas de núcleo conservadas forman tres fuentes de disulfuro. El dominio EGF1 de FVII enlaza solo un ión Ca^{2+}, pero con afinidad significativa más alta que aquella observada con el dominio Gla (Banner *y colaboradores* (1996) Nature 380:41-46). Este ión Ca^{2+} enlazado promueve la fuerte interacción entre el dominio EGF1 de FVII y TF (Osterlund *y colaboradores* (2000) Eur J Biochem 267:6204-

146

6211). El segundo dominio similar a EGF (2 similar a EGF 2 o EGF2) no es un dominio de enlace de calcio, sino también forma 3 puentes de disulfuro. Similar a los otros dominios en FVII, el dominio EGF2 interactúa con TF. También se enlaza con disulfuro junto con el dominio de proteasa, con el cual comparte una gran interface de contacto.

Finalmente, el dominio de serina proteasa de FVII es el dominio responsable para la actividad proteolítica de FVIIa. La secuencia de aminoácidos de FVII en su dominio catalítico exhibe alta identidad de secuencia y similitud de estructura terciaria con otras serina proteasas tal como tripsina y quimotripsina (Jin *y colaboradores* (2001) J Mol Biol, 307: 1503-1517). Por ejemplo, estas serina proteasas comparten una triada catalítica común H57, D102, S195, con base en la numeración de la quimotripsina. Diferente a otras serina proteasas, sin embargo, la escisión de FVIIa no es suficiente para completar la conversión del zimógeno a una enzima totalmente activa. En lugar, como se plantea posteriormente, FVIIa se activa alostéricamente en su fusión catalítica al enlazarse al receptor de superficie celular TF, la cual induces un cambio conformacional en el dominio FVIIa proteasa que cambia de un estado inactivo similar a zimógeno a una enzima catalíticamente activa. Una región de bucle de hélice entre el sitio de enlace del co-factor de sitio activo (*posiciones* de residuos de aminoácidos 305-321, que corresponden a los residuos 163-170i en la numeración de la quimotripsina) de FVIIa es importante para la alosteria y zimogenicidad de FVIIa (Persson *y colaboradores* (2004) Biochem J., 379: 497-503). Esta

147

región se compone de una hélice α corta (posiciones de residuos de aminoácidos 307 a 312) seguido por un bucle. La porción N-terminal de la hélice forma parte de la interfaz entre el dominio de proteasa y TF, y contiene una variedad de residuos que son importantes para la función proteolítica y el enlace óptimo a TF. Una comparación de la estructura de cristal de FVIIa solo y FVIIa formado en complejo con TF indica que la hélice α se somete a un cambio conformacional significativo cuando FVIIa se enlaza a TF. La hélice α de FVIIa solo parece que se distorsiona, se acorta y se orienta de manera diferente. Esto afecta las estructuras de bucle adyacentes, que se mueven lejos del sitio activo. En contraste, la hélice α de FVIIa cuando se forma en complejo con TF se estabiliza, y los bucles vecinos se posicionan más cerca al sitio activo. Esta estabilización se efectúa a través de los mecanismos que indican por lo menos la metionina en la posición de aminoácidos 306 (residuo de aminoácido Met^{164} por la numeración de la quimotripsina) de FVII (Pike *y colaboradores* (1999) PNAS 8925-8930).

2. Modificaciones Postraduccionales

El polipéptido precursor FVII (cualquier isoforma del gen del VII) se fija como objetivo a la vía secretora celular por el péptido de señal hidrofóbico, el cual se inserta en el retículo endoplásmico (ER) para iniciar la translocación a través de la membrana. Mientras que la proteína se translocaliza a través de la membrana ER, el péptido de señal de 20 aminoácido se escinde por una peptidasa de señal dentro del lumen ER, después de lo cual el polipéptido se somete a

000118

modificaciones pos-traduccionales adicionales, que incluyen N- y O-glicosilación, carboxilación dependiente de vitamina K de ácidos glutámicos N-terminal a ácidos γ-carboxiglutámico, e hidroxilación de ácido aspártico a ácido β-hidroxiaspártico.

El propéptido proporciona un sitio de enlace para una carboxilasa dependiente de vitamina K que reconoce una hélice α anfipática de 10 residuos en el propéptido FVII. Después del enlace, los γ-carboxilatos de carboxilasa de 10 residuos de ácido glutámico dentro del dominio Gla del polipéptido FVII, que produce residuos de γ-carboxiglutamilo en las posiciones E66, E67, E74, E76, E79, E80, E85, E86, E89 y E95 relativas con la secuencia de aminoácidos precursora FVII expuesta en SEQ ID NO: 2. Estas posiciones corresponden a las posiciones E6, E7, E 14, E 19, E20, E25, E26, E29 y E35 del polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3. Para la actividad óptima, la molécula de FVII requiere calcio, el cual enlaza el polipéptido y facilita los cambios conformacionales necesarios para el enlace de FVIIa con TF y lípidos. El dominio Gla γ-carboxilado enlaza siete iones Ca^{2+} con afinidad variable, lo cual induce al cambio conformacional que permite que el dominio Gla interactúe con el dominio C-terminal de TF, y también las fosfatidilserinas u otros fosfolípidos negativamente cargados sobre la membrana de las plaquetas.

La glicosilación ligada en N se lleva a cabo por la transferencia de Glc_3Man_9 (GlcNAc) a dos residuos de asparagina en el polipéptido FVII, en posiciones que corresponden a los residuos de aminoácidos 145 y 322 de la proteína madura (SEQ ID

119

NO:3). La glicosilación enlazada con O ocurre en los residuos de aminoácido 52 y 60 y en el polipéptido maduro, y la hidroxilación a un ácido β-hidroxiaspártico ocurre en el residuo de ácido aspártico en la posición 63. Estos residuos de serina O-glicosilados y el residuo de ácido aspártico β-hidroxilado están en el dominio EGF-1 de FVII. Estas modificaciones se efectúan en el complejo ER y Golgi antes del procesamiento final del polipéptido a su forma madura.

3. Procesamiento del FVII

El polipéptido pro-FVII modificado se transporta a través del lumen de Golgi al compartimiento trans-Golgi donde el propéptido se escinde por una propeptidasa justo antes de la secreción de la proteína de la célula. La PACE/furina (donde PACE es un acrónimo para Enzima de Escisión de Aminoácidos Básicos Pareados) es una endopeptidasa localizada en la membrana de Golgi que escinde muchas proteínas sobre el lado carboxi terminal del motivo de secuencia Arg-[cualquier residuo]-(Lys o Arg)-Arg. Esta propeptidasa escinde las glicoproteínas dependientes de vitamina K tal como los polipéptidos de pro-factor IX y pro-vWF (Himmelspach *y colaboradores* (2000) Thromb Research 97; 51-67), liberando el propéptido de la proteína madura. La inclusión de un sitio de reconocimiento PACE/furina apropiado dentro de los precursores de Factor VII recombinantes facilita el procesamiento y secreción correcta del polipéptido recombinante (Margaritas *y colaboradores* (2004) Clin Invest 113(7): 1025-1031). La PACE/furina, u otra enzima propeptidasa similar a subtilisina, es probablemente responsable por el procesamiento proteolítico

150

000120

de pro-FVII a FVII. Puede reconocer y enlazarse al motivo consenso -Arg-Arg-Arg-Arg- en las posiciones de aminoácidos 35-38 de las secuencias expuestas en SEQ ID NO:1, y las posiciones 57-60 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO:2, escindiendo el polipéptido y liberando la proteína madura para la secreción.

4. Activación del FVII

La vasta mayoría de FVII en la sangre está en la forma de un zimógeno de cadena individual no activado, aunque una pequeña cantidad está presente en una forma activada de dos cadenas. La activación de FVII ocurre en la escisión proteolítica en el enlace Arg^{152}-Ile^{153} (posiciones relativas con el polipéptido FVII maduro, expuesto en SEQ ID NO:3), dando origen a un polipéptido de dos cadenas que contiene una cadena ligera de 152 aminoácido (aproximadamente 20 kDa) enlazada por un puente de disulfuro a una cadena pesada de 254 aminoácido (aproximadamente 30 kDa). La cadena ligera de FVIIa contiene el dominio Gla y los dominios similares a EGF, mientras que la cadena pesada contiene la porción catalítica o de serina-proteasa de la molécula. La conversión del FVII de cadena individual en el FVIIa de dos cadenas es mediada por la escisión por FIXa, FXa, FXIIa, trombina, o en una manera autocatalítica por el FVIIa endógeno (Butenas *y colaboradores* (1996) Biochem 35:1904-1910; Nakagaki *y colaboradores* (1991) Biochem 30:10819-10824). La cantidad traza de FVIIa que ocurre en la circulación surge probablemente de la acción de FXa y FIXa.

Como se plantea anteriormente, la escisión de FVII de su forma de zimógeno a FVIIa no es suficiente para la actividad

151

total. FVIIa requiere la asociación con TF para la actividad total (Higashi *y colaboradores* (1996) J Biol Chem 271 :26569-26574). Debido a este requerimiento, FVIIa solo se han escrito características similares a zimógeno, que muestra el plegamiento y forma del zimógeno, y exhibe actividad relativamente baja. Esta característica similar a zimógeno de FVIIa en ausencia de su asociación con TF lo hace relativamente resistente a la antitrombina III (AT-III) y otras serpinas, las cuales actúan generalmente, principalmente sobre las formas activas de la serina proteasa antes que la forma de zimógeno. Además, TFPI, el inhibidor principal de la actividad de TF/FVIIa, tampoco se enlaza eficientemente a la forma no formada en complejo "inactiva" de FVIIa.

En la formación de complejos con TF, el FVIIa se somete a un cambio conformacional que permite actividad total de la molécula. Todos los dominios FVII se implican en la interacción con TF, pero los cambios conformacionales que ocurren se localizan en el dominio de proteasa de FVIIa. Por ejemplo, los cambios conformacionales que ocurren en la interacción alostérica de FVIIa y TF incluyen la creación de un exositio de enlace de substrato macromolecular extendido. Este sito de enlace extendido mejora grandemente la activación proteolítica mediada por FVII del factor X.

La actividad de FVIIa se incrementa adicionalmente (*es decir* miles de veces) cuando la interacción de FVIIa es con el TF de superficie celular expresada. Esto es debido a que las membranas de fosfolípido que contiene fosfolípidos negativamente cargados, tal como fosfatidilserina, son un sitio

152

de interacción de otros factores de coagulación dependientes de vitamina K tal como FIX y FX, los cuales se enlazan por la vía de sus dominios Gla. De esta manera, la concentración local de estas proteínas dependientes de vitamina K es más alta en la superficie celular, promoviendo su interacción con el complejo TF/FVIIa.

5. Función del FVII

Aunque el FVIIa exhibe actividad incrementada después de la activación alostérica por el TF, hay evidencia de que los mecanismos existen en los cuales el FVIIa solo puede iniciar la coagulación. Por consiguiente, el FVII puede funcionar de una manera dependiente de TF e independiente de TF. Esta última vía puede desempeñar una función mucho más pequeña en la hemostasis normal, aunque su importancia podría incrementarse cuando se considera en el contexto de los trastornos de sangrado, y el tratamiento de los mismos.

a. Actividad del FVIIa dependiente del factor de tejido

El FVII circulante enlaza el TF de superficie celular y se activa por FIXa, FXa, trombina, o de una manera autocatalítica por el FVIIa endógeno como se describe anteriormente. Alternativamente, la cantidad muy pequeña de FVIIa circulante puede enlazar directamente TF. El complejo TF/FVIIa luego enlaza una fracción pequeña del FX plasmático y el dominio catalítico de FVIIa escinde a FX para producir FXa. La trombina se forma de esta manera por la vía de la ruta extrínseca sobre la superficie de la célula que lleva TF, cuando FXa se forma en complejo con FVa y activa la protrombina a trombina (Figura 3). El FIX también se activa por el complejo TF/FVIIa,

153

000123

proporcionando un enlace a la vía intrínseca que opera sobre la superficie de la plaqueta activada. Los sistemas de retroalimentación positiva de la cascada de coagulación descrita anteriormente proporcionan los medios por los cuales se producen grandes cantidades de trombina, la cual escinde el fibrinógeno en fibrina para formar un coágulo.

b. Actividad del FVIIa independiente del factor de tejido

Además del mecanismo dependiente de TF para la activación de FX a FXa, existe evidencia que FVIIa también puede activar FX en ausencia de TF. Las plaquetas activadas translocalizan las fosfatidilserinas y otros fosfolípidos negativamente otros fosfolípidos negativamente cargados a la superficie de plasma orientada, exterior. (Hemker *y colaboradores* (1983) Blood Cells 9:303-317). Estas proporcionan "receptores" alternativos a través de los cuales FVIIa puede enlazarse, aunque con una afinidad relativamente baja que es 1000 veces menor que la afinidad de enlace de FVIIa a TF (Monroe *y colaboradores* (1997) Br J Haematol 99:542-7). Esta interacción es mediadas a través de residuos en el dominio Gla (Harvey *y colaboradores* (2003) 278:8363-8369). El FVIIa puede convertir FX a FXa y FIX a FIXa sobre la superficie de plaquetas activadas (Hoffman *y colaboradores* (1998) Blood Coagul Fibrinolysis 9:S61-S65). El FXa permanece asociado con la superficie de plaquetas, donde se puede enlazar a FVa y generar suficiente trombina de la protrombina mientras que los ensambles de FIXa recientemente formados con FVIIIa para catalizar la activación de más de FX a FXa (Figura 3). La hemostasis en ausencia de TF luego se puede

154

000124

lograr por los mecanismos de retroalimentación y propagación positiva descrita anteriormente. Es notable, sin embargo, que mientras que FVIIIa puede contribuir al proceso de coagulación sobre la plaqueta activada, su presencia no es requerida para la generación de trombina en un mecanismo independiente de TF (Figura 3). De esta manera, en ausencia de FVIII, tal como en pacientes con hemofilia, existe evidencia de que el FVIIa puede iniciar y/o amplificar la generación de trombina a través de este mecanismo secundario y efectuar la formación de coágulos.

6. FVII como un biofarmacéutico

El FVII funciona para iniciar la coagulación de la sangre. El FVIIa recombinante (NovoSeven^{MR}; rFVIIa) se aprueba para el tratamiento de episodios hemorrágicos o prevención de hemorragia en procedimientos quirúrgicos o invasivos en pacientes que tienen hemofilia A o B con inhibidores para el Factor VIII o Factor IX, y en pacientes con deficiencia del Factor VII congénita. El NovoSeven^{MR} es una preparación genéticamente diseñada del factor VIIa que se produce en un sistema de expresión de mamífero usando células de riñón de hámster bebes (BHK). El agente es casi idéntico al factor VIIa derivado de plasma en su estructura y función (Ratko *y colaboradores* (2004), P & T, 29: 712-720).

La administración de FVIIa recombinante (rFVIIa) se ha mostrado que promueve la coagulación de la sangre en pacientes que sufren de hemofilia, y el tratamiento con dosis de FVIIa se ha descubierto que es segura y bien tolerada en sujetos humanos. Típicamente, el uso de rFVIIa ha sido en pacientes quienes han desarrollado inhibidores (*es decir* aloanticuerpos)

155

al Factor VIII o Factor IX. El uso de rFVIIa como un coagulante se ha extendido al tratamiento de otros trastornos de sangrado, por ejemplo trombastenia de Glanzmann; otros eventos asociados con hemorragia extensiva, tal como un resultado de trauma o cirugía que incluye, pero no se limita a, trasplantes de hígado, cirugía de la próstata y trauma hemorrágico; coagulopatías neonatales, enfermedad hepática grave; trasplante de médula ósea, trombocitopenias y trastornos de la función de plaquetas; reversión urgente del anticoagulación oral; deficiencias congénitas de los factores V, VII, X, y XI; y enfermedad de von Willebrand con inhibidores al factor von Willebrand.

Una dosis alta de rFVII es requerida para lograr un efecto terapéutico. La dosis y régimen de dosificación requerido para la administración de rFVII varía dependiendo de la indicación clínica. Por ejemplo, la dosificación típica de rFVII para los episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A o hemofilia B que tienen aloanticuerpos es 90 µg/kg administrado por inyección intravenosa (IV). Puesto que rFVII tiene una vida media de 2 horas, se requiere dosificación repetida. La dosificación adicional se puede proporcionar cada dos horas hasta que se logra la hemostasis. El intervalo de dosificación se puede alterar dependiendo de la gravedad de la condición. Por ejemplo, las dosis que varían de 35 - 120 µg/kg han sido eficaces. También, la dosis y régimen de dosificación puede variar con otras indicaciones. Por ejemplo, los pacientes con hemofilia A o hemofilia B que se someten a la cirugía se pueden administrar con una dosis inicial de 90 µg/kg inmediatamente

antes de la cirugía, con una dosificación de repetición administrada cada dos horas durante y después de la cirugía. Dependiendo de la gravedad de la cirugía y el episodio del episodio hemorrágico, la infusión de IV de bolo puede continuar cada dos a seis horas hasta que se logra la sanación. En los pacientes deficientes de FVII congénito, el rFVII se administra típicamente para evitar la hemorragia en la cirugía u otros procedimientos invasivos en 15 - 30 µg/kg cada 4-6 horas hasta que se logra la hemostasis.

El mecanismo de acción de rFVIIa para iniciar la hemostasis explica el requerimiento de dosis alta. Los pacientes con hemofilia tienen una fase de iniciación normal de coagulación, donde el complejo TF/FVIIa activa FX a FXa y conduce a la producción de trombina en el sitio de la célula que lleva TF. Después, sin embargo, el proceso de coagulación se rompe conforme los pacientes con hemofilia carece de FVIII (hemofilia A) o FIX (hemofilia B), y por lo tanto son incapaces de formar los complejos FVIIIa/FIXa sobre la superficie de la plaqueta activada, la cual sirve normalmente para activar grandes cantidades de FX a FXa en las fases de amplificación y propagación descritas previamente, debido a la presencia de los inhibidores, tales como TFPI y AT-III, el FXa que se produce sobre la célula que lleva TF después de la escisión por TF/FVIIa es incapaz de difundirse fácilmente entre las superficies celulares. Como resultado, la generación de trombina a gran escala sobre la superficie de la plaqueta activada no ocurre, y no se forma un coagulo.

Existe evidencia de que el efecto hemostático de altas

157

dosis de rFVIIa se puede lograr usando la generación dependiente de TF y/o independiente de TF de FXa por rFVIIa sobre las plaquetas activadas (Figura 3). La generación de trombina dependiente de TF se puede maximizar muy rápidamente con la saturación de moléculas TF con FVIIa endógeno y rFVIIa. En algunos casos, las altas dosis de rFVIIa pueden enlazar las plaquetas activadas y convertir FX a FXa. El FXa asociado con la superficie activa el FVa para generar suficiente trombina para la hemostasis. Puesto que rFVII se enlaza a la superficie de la plaqueta con baja afinidad, una dosis más alta de rFVII se puede requerir para la generación de trombina. La activación de FXa sobre las plaquetas activadas asegura que la hemostasis mediada por rFVIIa se localiza al sitio de la lesión.

Un medio para lograr una dosificación reducida de rFVII puede mejorar su utilidad y eficiencia como un fármaco. Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII. Entre éstos son los polipéptidos FVII modificados que exhiben resistencia incrementada a AT-III y actividad catalítica incrementada en presencia y/o ausencia de TF. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento también pueden exhibir resistencia incrementada a TFPI, resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+}, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tal como vida media de suero incrementada, enlace y/o afinidad incrementada para las plaquetas activadas, enlace incrementado y/o afinidad para la albúmina de suero, y/o enlace y/o afinidad incrementada para la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$. Estos polipéptidos FVII modificados pueden exhibir actividad coagulante incrementada. Los polipéptidos FVII proporcionados

158

000128

en este documento se pueden usar en tratamientos para iniciar la hemostasis en un mecanismo dependiente de TF y/o independiente de TF tal que FXa se produce y la trombina se genera.

D. Polipéptidos FVII modificados

Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados. Los polipéptidos FVII exhiben alteraciones en una o más actividades o propiedades comparadas con el polipéptido FVII que no se modifica de esta manera. Las actividades o propiedades que se pueden alterar como resultado de la modificación incluyen, pero no se limitan a, coagulación o actividad coagulante; actividad procoagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como para efectuar la activación del factor X (FX) o la activación del Factor IX (FIX); antigenicidad (capacidad de enlazarse a o competir con un polipéptido para enlazarse a un anticuerpo anti-FVII); capacidad para enlazar el factor de tejido, factor X o factor IX; capacidad para enlazarse a los fosfolípidos; vida media; estructura tridimensional; pi; y/o conformación. Típicamente, los polipéptidos FVII modificados exhiben actividad procoagulante. Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que exhiben actividad coagulante incrementada en la activación de su forma de zimógeno de cadena individual. Estos polipéptidos FVII modificados se pueden usar en el tratamiento de trastornos o eventos hemorrágicos, tales como hemofilias o lesiones, donde los polipéptidos FVII pueden funcionar para promover la coagulación de la sangre. Incluidos entre estos polipéptidos FVII modificados son aquellos que

159

tienen resistencia incrementada a los inhibidores tal como la antitrombina III (AT-III) y el inhibidor de vía de factor de tejido (TFPI), aquellos que tienen resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+}, aquellos que tienen actividad catalítica incrementada en presencia y/o ausencia de TF, aquellos que tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas, tal como vida media incrementada, aquellos que tienen enlace y/o afinidad incrementada para la superficie de la plaqueta, aquellas que tienen enlace y/o afinidad incrementada para la albúmina de suero, y aquellos que tienen enlace y/o afinidad incrementada para la integrina de la plaqueta $\alpha_{IIb}\beta_3$. En particular, estos polipéptidos FVII modificados se pueden usar en enfermedades o condiciones para proporcionar actividad coagulante mientras que al mismos tiempo desvían los requerimientos para FVIIIa y FIXa. En un ejemplo, los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden usar en pacientes hemofílicos que tienen autoanticuerpos FVIIIa y FIXa. Por consiguiente, los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento ofrecen ventajas que ocurre una disminución en la cantidad de FVII administrado que es requerido para mantener una concentración suficiente de FVII activo en el suero para la hemostasis. Esto puede conducir a, por ejemplo, dosis más bajas y/o frecuencia de dosificación necesaria para lograr efectos biológicos comparables, comodidad superior y aceptación por los sujetos, y atenuación de los efectos secundarios.

Las modificaciones en un polipéptido FVII se pueden hacer para cualquier forma de un polipéptido FVII, que incluye

160

variantes alélicas y especies, variantes de empalme, variantes conocidas en el campo o moléculas FVII híbridas o quiméricas. Por ejemplo, las modificaciones proporcionadas en este documento se pueden hacer en un polipéptido FVII precursor expuesto en SEQ ID NOS: 1 o 2, un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3, o cualquiera de las especies, variantes alélicas o modificadas y fragmentos activos de las mismas, que tiene 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de los polipéptidos FVII expuestos en SEQ ID NOS: 1-3. Las variantes alélicas de FVII incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de aquellos polipéptidos precursores que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOS: 18-74. Variantes de especies ejemplares para la modificación en este documento incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos humanos y no humanos que incluyen polipéptidos FVII de vaca, ratón, chimpancé enano, chimpancé, conejo, rata, mono rhesus, cerdo, perro, pez cebra, pez globo, pollo, orangután y polipéptidos FVII de gorila, aquellas secuencias se exponen en SEQ ID NOS: 4-17 respectivamente. Las modificaciones en un polipéptido FVII se pueden hacer para un polipéptido FVII que también contiene otras modificaciones, tales como aquellas descritas en el campo, que incluyen modificaciones de la secuencia primaria y modificaciones no en la secuencia primaria del polipéptido.

La modificación de los polipéptidos FVII también incluye la modificación de los polipéptidos que son híbridos de polipéptidos FVII diferentes y también polipéptidos FVII

161

sintéticos preparados recombinantemente o sintetizados o construidos mediante otros métodos conocidos en el camp con base en la secuencia de los polipéptidos conocidos. Por ejemplo, con base en la alineación de FVII con otros miembros de la familia del factor de coagulación, tal como el factor IX (FIX) o factor X (FX), dominios homólogos entre los miembros de la familia se identifican fácilmente. Las variantes quiméricas de los polipéptidos FVII se pueden construir donde uno o más aminoácidos o dominios enteros se reemplazan en la secuencia de aminoácidos FVII usando la secuencia de aminoácidos del miembro de la familia correspondiente. Adicionalmente, los polipéptidos FVII quiméricos incluyen aquellos donde uno o más aminoácidos o dominios completos se reemplazan en la secuencia de aminoácidos FVII humana usando la secuencia de aminoácidos de una especie diferente *véase, por ejemplo*, Williamson *y colaboradores* (2005) J Thromb Haemost 3: 1250-6). Estas proteínas quiméricas se pueden usar como el polipéptido FVII no modificado, de partida en este documento.

Las modificaciones proporcionadas en este documento de un polipéptido de referencia no modificado, de partida incluyen reemplazos de aminoácidos o sustitución, adiciones o supresiones de aminoácidos, o cualquiera combinación de los mismos. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados incluyen aquellos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más de posiciones modificadas. También se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados con dos o más modificaciones comparadas con un polipéptido FVII de referencia de partida. Los polipéptidos

FVII modificados incluyen aquellos con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más de posiciones modificadas. Cualquier modificación proporcionada en este documento se puede combinar con cualquier otra modificación conocida por aquellas personas expertas en el campo siempre y cuando el polipéptido FVII modificado resultante exhiba actividad de coagulación incrementada cuando está en su forma de dos cadenas. Típicamente, los polipéptidos FVII modificados exhiben actividad coagulante incrementada. Las actividades o propiedades que se pueden alterar como resultado de la modificación incluyen, pero no se limita a, coagulación o actividad coagulante; actividad procoagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como efectuar la activación del factor X (FX) o activación del Factor IX (FIX); antigenicidad (capacidad de en lazarse a o competir con un polipéptido para enlazarse a un anticuerpo anti-FVII); capacidad para enlazarse al factor de tejido, factor inhibidor del factor de tejido (TFPI), antitrombina III, factor X o factor IX; capacidad para enlazarse a fosfolípidos, albumina de suero o integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$; vida media del suero; estructura tridimensional; pi; y/o conformación. Incluidos entre los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento son aquellos que tienen resistencia incrementada a la antitrombina III (AT-III), actividad catalítica incrementada en presencia y/o ausencia de TF, resistencia incrementada al inhibidor de la vía del factor de tejido (TFPI), resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+}, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tal como vida media de suero

incrementada, actividad intrínseca incrementada, glicosilación alterada, afinidad y/o enlace incrementado para la albúmina de suero, afinidad y/o enlace incrementados para la integrina de plaqueta y/o afinidad y/o enlace incrementados para las plaquetas activadas.

En algunos ejemplos, una modificación puede afectar dos o más propiedades o actividades de un polipéptido FVII. Por ejemplo, una modificación puede dar por resultado una resistencia incrementada AT-III y actividad catalítica incrementada del polipéptido FVII modificado comparado con un polipéptido FVII no modificado. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden someter a ensayo para cada propiedad y actividad para identificar el intervalo de efectos de una modificación. Estos ensayos son conocidos en el campo y se describen posteriormente. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento también incluyen polipéptidos FVII que se modifican adicionalmente por la maquinaria celular e incluyen, por ejemplo, polipéptidos glicosilados, γ-carboxilados y β-hidroxilados.

Las modificaciones proporcionadas en este documento para un polipéptido FVII se hacen para incrementar la resistencia a AT-III, incrementar la resistencia TFPI, incrementar la resistencia a los efectos inhibidores de Zn^{2+}, mejorar las propiedades farmacocinéticas, tal como incrementar la vida media del suero, incrementar la actividad catalítica en presencia y/o ausencia de TF, incrementar el enlace a las plaquetas activadas, alterar la glicosilación, incrementar la

afinidad y/o enlace a la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$, incrementar la afinidad y/o enlace a la albúmina de suero, y/o incrementar la afinidad y/o enlace para las plaquetas activadas. Por ejemplo, un polipéptido FVII puede incluir una(s) modificación(es) que incrementa(n) una o ambas de actividad catalítica y enlace a las plaquetas. En otros ejemplos, cualquier modificación proporcionada en este documento se puede combinar con cualquier otra modificación conocida por aquellas personas expertas en el campo siempre y cuando el polipéptido FVII modificado resultante exhiba actividad de coagulación incrementada cuando está en su forma de dos cadenas. Típicamente, esta actividad de coagulación incrementada es debido a la resistencia incrementada a AT-III, actividad catalítica incrementada, resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+}, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tal como vida media del suero incrementada, resistencia incrementada a TFPI, glicosilación alterada, enlace y/o afinidad incrementada para los fosfolípidos, enlace y/o afinidad incrementada para la albúmina de suero, y/o enlace y/o afinidad incrementada para la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$. En algunos ejemplos, las modificaciones que se introducen en un polipéptido FVII para alterar una actividad específica o propiedad, también, o en lugar, pueden afectar otra actividad o propiedad. De esta manera, las modificaciones proporcionadas en este documento pueden afectar la propiedad o actividad que se diseñaron para afectar y una o más de otras propiedades o actividades. Por ejemplo, las modificaciones hechas a un polipéptido FVII para incrementar la actividad catalítica

165

también pueden incrementar la resistencia a AT-III. En algunos ejemplos, una modificación individual, tal como una sustitución de aminoácido individual, altera 2, 3, 4 o más propiedades o actividades de un polipéptido FVII. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en la presentes se pueden someter a ensayo para cada propiedad y actividad para identificar el intervalo de efectos de una modificación. Estos ensayos son conocidos en el campo y se describen posteriormente. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados es este documento también incluyen polipéptidos FVII que se modifican adicionalmente por la maquinaria celular e incluyen, por ejemplo, polipéptidos glicosilados, γ-carboxilados y β-hidroxilados.

Las modificaciones proporcionadas en la presente se pueden hacer mediante técnicas de ADN recombinante estándares tales como son rutina para una persona experta en el campo. Cualquier método conocido en el campo efectúa la mutación de cualquiera o más de aminoácidos en una proteína objetivo que se puede emplear. Los métodos incluyen mutagénesis dirigida de sitio estándar (usando *por ejemplo*, un kit, tal como el kit tal como QuikChange disponible de Stratagene) de la codificación de moléculas de ácidos nucleicos, o mediante los métodos de síntesis de polipéptido de fase sólida. Además, las proteínas quiméricas modificadas proporcionadas en este documento (*es decir* intercambio de domino Gla) se puede generar mediante técnicas de ADN recombinante de rutina. Por ejemplo, los polipéptidos quiméricos se pueden generar usando enzimas de restricción y metodologías de coagulación para la clonación de

000136

rutina de los componentes de polipéptido quimérico deseados.

Otras modificaciones que están o no están en la secuencia primaria del polipéptido también se pueden incluir en un polipéptido FVII modificado, o conjugado del mismo, que incluye, pero no se limita a, la adición de una porción de carbohidrato, la adición de una porción de polietilenglicol (PEG), la adición de un dominio Fc, etcétera. Por ejemplo, estas modificaciones adicionales se pueden hacer para incrementar la estabilidad o vida media de la proteína.

Los polipéptidos FVII modificados resultantes incluyen aquellos que son polipéptidos de zimógeno de cadena individual o aquellos que son polipéptidos similares a zimógeno de dos cadenas. Por ejemplo, cualquier polipéptido modificado proporcionado en este documento que sea un polipéptido de cadena individual se puede autoactivar o activar por otros factores de coagulación para generar un FVII modificado que es una forma de dos cadenas (*es decir* FVIIa). Las actividades de un polipéptido FVII modificado se exhiben típicamente en su forma de dos cadenas.

Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento pueden exhibir resistencia a AT-III incrementada, actividad catalítica incrementada en presencia y/o ausencia de TF, resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+}, resistencia a TFPI incrementada, por propiedades farmacocinéticas mejoradas, tal como vida media del suero incrementada, glicosilación alterada, enlace y/o afinidad incrementada para los fosfolípidos, enlace y/o actividad incrementada para la albúmina de suero, y/o enlace y/o afinidad

167

incrementada para la integrina de plaquetas α_{IIb},β_3. Típicamente, estas propiedades y/o actividades de los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se hacen mientras que retienen otras actividades o propiedades de FVII tal como, pero no se limitan a, enlace a TF y/o enlace y activación de FX. Por consiguiente, los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento retienen el enlace TF y/o el enlace FX en la activación como es comparado con una forma de tipo silvestre o de partida del polipéptido FVII. Típicamente, esta actividad no es cambia sustancialmente (menor que 1%, 5% o 10% cambiada) comparada con una proteína de tipo silvestre o de partida. En otros ejemplos, la actividad de un polipéptido FVII modificado se incrementa o se disminuye como es comparado con un polipéptido FVII de tipo silvestre o de partida. La actividad se puede estimar in vitro o in vivo y se puede comparar con el polipéptido FVII no modificado, tal como por ejemplo, el polipéptido FVII nativo de tipo silvestre maduro (SEQ ID NO: 3), el polipéptido FVII precursor de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1 o 2), o cualquier otro polipéptido FVII conocido por una persona experta en el campo que se usa como el material de partida.

Por consiguiente, en virtud de las modificaciones proporcionadas en este documento, los polipéptidos FVII modificados pueden exhibir actividad coagulante incrementada, duración incrementada de la actividad coagulante, y/o un índice terapéutico mejorado. Esto se puede observar de una manera dependiente de TF y/o independiente de TF. Típicamente, la actividad coagulante incrementada, durante incrementada de la

000138

actividad coagulante, y/o un índice terapéutico mejorado de los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden observa *in vivo* o *ex vivo* en ensayos apropiados, o *in vivo*, tal como en la administración a un sujeto, tal como un sujeto humano o no humano. La actividad incrementadas de los polipéptidos FVII modificados se puede incrementar por lo menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 1 10%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con la actividad del polipéptido d FVIIa de partida o no modificado.

1. Actividad catalítica incrementada

El FVII contiene un residuo de serina (posición 195 en la numeración de quimotripsin(ógeno) estándar) en su centro activo que actúa como un nucleófilo durante la reacción de escisión. La triada catalítica de la serina proteasas también incluye dos residuos adicionales: H57 y D 102 (numeración de la quimotripsina). La triada catalítica del FVIIa humano corresponde a H193, D242 y S344 del polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3. Estos tres aminoácidos clave desempeñan cada uno una función esencial en la actividad catalítica de las proteasas. Las serina proteasas hidrolizan los enlaces de péptido por la vía de la transformación de los estados de transición tetraédricos y los intermediarios de acilo-enzima. La vía de reacción que comienza con el enlace no covalente del substrato dentro de una ranura sobre la superficie de la proteasa (*es decir*, la hendidura del sitio activo) que contiene H57 y S195 para formar un "complejo de

Michaelis-Menton". El progreso productivo a lo largo de la vía de reacción requiere el ataque nucleofílico subsecuente del residuo de carbonilo P1 del substrato por la O-gamma de la serina del sitio activo (es decir, serina 195) de la enzima para formar un estado de transición tetraédrico que se convierte rápidamente en un intermediario de acilo-enzima. Una estructura dentro de la hendidura del sitio activo que incluye los residuos de glicina 193 y serina 195 (que corresponden a G342 y S344 del polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3) y se conoce como el orificio de oxianión que promueve la catálisis eficiente al estabilizar el estado de transición. Específicamente, los hidrógenos de amida de cadena principal de estos dos residuos forman los enlaces de hidrógeno de estabilización con el oxianión (es decir, el oxígeno de carbonilo del residuo P1) que es secretado en el estado de transición tetraédrico. Además de esta estabilización, el enlace del substrato dentro del orificio de oxianión posiciona el enlace escindible apropiadamente para las reacciones de acilación y desacilación productoras que dan por resultado la escisión de enlace. La importancia del orificio de oxianión y en la actividad FVII se resalta por la observación de que las mutaciones en la posición de aminoácidos 342 (que corresponde a 193 por la numeración de quimotripsina) puede dar por resultado una deficiencia de FVII (véase por ejemplo Bernardi *y colaboradores*, (1994) Br. J. Haematol. 86:610-618 y Bernardi *y colaboradores*, (1996) Human Mut. 8:108-1 15).

a. Modificaciones ejemplares para incrementar la actividad catalítica

Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que exhiben actividad coagulante e incrementada. Estos polipéptidos FVII se pueden generar mediante la sustitución de aminoácidos de uno o más residuos que pueden afectar la conformación el orificio del oxianión. La introducción de diferentes residuos de aminoácidos en posiciones particulares (por ejemplo, la posición 143 por la numeración de la quimotripsina in 286 por la numeración de FVII maduro) puede alterar la conformación del polipéptido FVII modificado tal que el orificio de oxianión es más efectivo durante la catálisis. Esto puede dar por resultado un polipéptido FVII modificado con actividad catalítica incrementada comparada con un polipéptido FVII no modificado. Los cambios en la actividad catalítica debido a las mutaciones que afectan el orificio de oxianión pueden manifestarse como actividad coagulante incrementada. Los incrementos en la actividad catalítica y coagulante de los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden observar en presencia y/o ausencia del factor de tejido (es decir pueden ser dependiente de TF y/o independientes de TF). De esta manera, cuando se evalúa en un ensayo *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo* apropiado tal como después de la administración a un sujeto como un agente terapéutico procoagulante, los polipéptidos FVII modificados pueden exhibir actividad coagulante incrementada comparada con aquellas de los polipéptidos FVII no modificados.

La conformación del orificio de oxianión se puede alterar para inducir una conformación más efectiva mediante la

modificación de uno o más residuos de aminoácidos que se implican en la formación de, o están en proximidad a, el orificio de oxianión. Como se proporciona en este documento, ejemplar de estos residuos de aminoácidos es Q286 (la numeración que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3), el cual corresponde a Q143 por la numeración de quimotripsina. El Q286 se puede modificar mediante, por ejemplo, la sustitución, supresión o inserción de aminoácidos. Cuando la modificación se efectúa mediante la sustitución de aminoácidos, el residuo de glutamina en la posición 286 se puede reemplazar con cualquier otro residuo de aminoácidos.

El Q286 se localiza adyacente a y en contacto con los residuos que forman las regiones de sitio activo y la hendidura de sitio activo del polipéptido FVII. Como tal, se ha establecido que la modificación en esta posición debe dar por resultado la actividad catalítica reducida (véase, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 6806063). Esto se ha demostrado en estudios previos (véase, por ejemplo, Publicación de Patente Internacional No. WO2007031559), donde el residuo de glutamina se reemplazó con una alanina (Q286A). El polipéptido FVIIa modificado resultado exhibe una capacidad reducida para activar el Factor X comparado con el polipéptido de tipo silvestre. En ostros estudios, la misma mutación no tuvo esencialmente efecto sobre la actividad catalítica del mutante FVIIa para el Factor X (Dickinson *y colaboradores*, (1996) Proc. Nat. Acad. Sci. EUA. 93:14379-14384) o un substrato sintético (Publicación de Patente Internacional No. WO2007031559).

172

Como se muestra en este documento véase el Ejemplo 4 y posteriormente), sin embargo, la modificación del polipéptido FVII en la posición 286 (numeración que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3; que corresponde a la posición 143 por la numeración de la quimotripsina), particularmente con un residuo básico, tal como arginina (Arg, R), da por resultado un polipéptido FVII modificado con actividad catalítica y coagulante incrementada.

De esta manera, se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que contienen una modificación, tal como un reemplazo de aminoácidos con un aminoácido básico, y en la posición de aminoácidos que corresponde a la posición de aminoácidos 286 del polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3 (posición de aminoácidos 143 por la numeración de la quimotripsina). Las modificaciones proporcionadas en este documento en la posición de aminoácidos 286 se pueden hacer en cualquier polipéptido FVII, que incluye un polipéptido FVII precursor expuesto en SEQ ID NOS: 1 o 2, un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3, o cualquier especie, variantes alélicas o modificadas y fragmentos activos de las mismas, que tiene 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de los polipéptidos FVII expuesto en SEQ ID NOS: 1-3.

La modificación de un polipéptido FVII en la posición de aminoácidos 286 por la numeración de FVII maduro (que corresponde al aminoácido 143 por la numeración de quimotripsina) puede alterar la conformación del orificio de oxianión a una conformación que facilita la catálisis más

efectiva de un substrato. La actividad catalítica incrementada de estos polipéptidos FVII modificados se puede exhibir en presencia y/o ausencia del factor de tejido, y se puede estimar usando ensayos *in vitro* tales como aquellos descritos en los Ejemplos 4 y 7, posteriormente. Además de exhibir actividad catalítica incrementada, los polipéptidos FVII que se han modificado en la posición de aminoácidos 286 por la numeración de FVII maduro también pueden exhibir resistencia incrementada a AT-III. Esto puede ser debido a, por ejemplo, el enlace reducido del polipéptido FVII modificado a AT-III bajo condiciones especificadas (por ejemplo, después de la inyección en un paciente) o una velocidad reducida de inactivación por ATIII (es decir, una segunda constante de velocidad de orden reducida para la inhibición), la cual puede manifestarse como actividad coagulante incrementada en presencia de AT-III comparado con un polipéptido FVII no modificado. La resistencia incrementada a AT-III se puede estimar usando ensayos *in vitro* tales como aquellos descritos en el Ejemplo 5.

El residuo de aminoácido Q286 por la numeración de FVII maduro (que corresponde a Q143 por la numeración de quimotripsina) se puede modificar mediante la supresión de aminoácidos, o reemplazo o sustitución con cualquier otro aminoácido. Alternativamente, un aminoácido se puede insertar inmediatamente antes o después de alterar la conformación en la vecindad del residuo de aminoácido Q286. Además, un polipéptido FVII que contiene una modificación de Q286 también puede contener una o más de otras modificaciones, que incluyen inserciones de aminoácidos, supresiones, sustituciones o

reemplazos, y modificaciones no en la secuencia primaria del polipéptido, tal como la adición de una porción de carbohidratos, la adición de una porción de polietilenglicol (PEG), la adición de un dominio Fc, etcétera, o cualquiera combinación de los mismos. De esta manera, un polipéptido FVII que contiene una modificación en la posición de aminoácidos 286 por la numeración de FVII maduro puede contener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más de posiciones modificadas. Estos polipéptidos retienen por lo menos una actividad de un polipéptido FVII no modificado. Típicamente, el polipéptido. FVII modificado exhibe actividad coagulante incrementada.

Estos cambios en las actividades pueden manifestarse como actividad coagulante incrementada, duración incrementada de la actividad coagulante, inicio incrementado del beneficio terapéutico, incremento del inicio de la actividad coagulante y/o un índice terapéutico mejorado. De esta manera, se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que contienen una modificación en la posición de aminoácidos 286 por la numeración de FVII maduro que exhibe actividad de coagulación incrementada comparado con un polipéptido FVII no modificado. Estos polipéptidos FVII modificados se pueden usar en el tratamiento de trastornos o eventos hemorrágicos, tales como hemofilias, cirugía, trauma y lesión, donde los polipéptidos FVII pueden funcionar para promover la coagulación de la sangre. Debido a una actividad coagulante incrementada, los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento que contienen una modificación en la posición de

000145

aminoácidos 286 por la numeración de FVII maduro ofrece ventajas sobre el tratamiento con un polipéptido FVII de tipo silvestre, tal como Factor VII NovoSeven^{MR}, que incluye una disminución en la cantidad del FVII administrado que se requiere para mantener una concentración suficiente de FVII activo en el suero para la hemostasis. Esto puede conducir a, por ejemplo, disminuir las dosis y/o frecuencia de dosificación necesaria para lograr efectos biológicos comparables, inicio más rápido del beneficio terapéutico, duración más prolongada de acción, comodidad superior y aceptación por los sujetos, y/o atenuación de los efectos secundarios indeseados.

i. Sustituciones de aminoácidos básicos en la posición 286

Se proporcionan polipéptidos FVII modificados en los cuales la glutamina en la posición 286 (numeración que corresponde al polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3; que corresponde a la posición 143 por la numeración de quimotripsina) se reemplaza con un residuo de aminoácido básico, tal como cualquiera de arginina (Arg, R), histidina (His, H) o lisina (Lys, K). En particular, se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados en los cuales la glutamina en la posición 286 se reemplaza con una arginina (es decir Q286R, que corresponde a Q143R por la numeración de quimotripsina). Los estudios de modelación indican que la sustitución de la glutamina con una arginina da por resultado la pérdida de dos interacciones claves que estabilizan una conformación inactiva del orificio de oxianión FVIIa en el FVII de tipo silvestre o no modificado. Las interacciones de

000146

desestabilizantes en el polipéptido FVII de tipo silvestre o no modificado incluyen la interacción entre la cadena lateral de Q286 (que corresponde a Q143 por la numeración de quimotripsina) y la amida de cadena principal de G342 (que corresponde a G193 por la numeración de quimotripsina), y la interacción entre el carbonilo de cadena principal de K341 (que corresponde a K1 por la numeración de quimotripsina) y la amida de cadena principal de S195 (que corresponde a S344 por la numeración de quimotripsina). Al sustituir la glutamina de tipo silvestre con una arginina a una posición de 286, sin embargo, no únicamente estas interacciones se pierden, sino se crean dos nuevas interacciones importantes. Estas incluyen la creación de un puente de sal entre la cadena lateral básica del aminoácido modificado R286 (R143 por la numeración de quimotripsina) y la cadena lateral ácido de D289 nativo (D 146 por la numeración de quimotripsina), y una interacción de la amida de cadena principal del aminoácido modificado R286 y el carbonilo de cadena principal de K341 que estabilizan una conformación activa del polipéptido FVIIa modificado. Adicionalmente, la nueva fuente de sal entre el aminoácido modificado R286 y D289 se espera que altere la conformación y/o flexibilidad del "bucle de autolisis," el cual forma parte de la hendidura de sitio activo. El bucle de autolisis se implica en determinar el substrato macromolecular y la especificidad inhibidoras de las proteasas de coagulación. De esta manera, una conformación alterada y/o flexibilidad de este bucle, por ejemplo, puede dar por resultado una actividad catalítica incrementada para el substrato (por ejemplo, factor X y/o factor IX) y resistencia

incrementada a inhibidores (por ejemplo TFPI y/o AT-III). De esta manera, la modificación de la glutamina en la posición 286 con un aminoácido básico, tal como arginina (Arg, R), histidina (His, H) o lisina (Lys, K), puede dar por resultado la actividad catalítica y coagulante incrementada comparada con el polipéptido FVII de tipo silvestre. Por consiguiente, se proporcionan en este documento polipéptidos FVII que contienen una mutación Q286R, Q286K o Q286H por la numeración de FVII maduro (que corresponde a Q143R, Q143K o Q143H, respectivamente, por la numeración de quimotripsina). Ejemplares de estos polipéptidos son aquellos con una secuencia de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOS: 118, 119 y 129, respectivamente.

El reemplazo del aminoácido de la glutamina (Gln, Q) con un residuo de aminoácido básico, en particular una arginina (Arg, R), en la posición de aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 286 de un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3 se puede hacer en cualquier polipéptido FVII, que incluye un polipéptido FVII precursor con una secuencia expuesta en SEQ ID NOS: 1 o 2, un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3, o cualquiera de las especies, variante alélica y modificada, tales como aquellas descritas en el campo, y fragmentos activos de las mismas, que tienen 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% identidad de secuencia de cualquiera de los polipéptidos FVII expuestos en SEQ ID NOS: 1-3. Por ejemplo, la mutación Q286R se puede incorporar dentro de cualquier polipéptido FVII modificado descrito en el campo que incluye

178

cualquiera de aquellos descritos en algún lugar en este documento. Estos polipéptidos FVII modificados incluyen, pero no se limitan a, un polipéptido FVII modificado que contiene la(s) mutación(es) M298Q (SEQ ID NO:158) véase por ejemplo Persson *y colaboradores*, (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. EUA 98:13583- 13588), E296V/M298Q (SEQ ID NO:343), V158E (SEQ ID NO:344), E296R/M298K (SEQ ID NO:345), K337A (SEQ ID NO:346), V158D/E296V/M298Q (SEQ ID NO:98; NN1731; véase por ejemplo, Persson *y colaboradores*, (2007) Art. Thromb. Vase. Biol. 27(3): 683-689), V158D/E296V/M298Q/K337A (SEQ ID NO:347; véase por ejemplo Lisman *y colaboradores*, (2003) J. Thromb. Haem. 1:2175-2178), V253N (SEQ ID NO:348; véase por ejemplo US7427592), T106N (SEQ ID NO:349; véase por ejemplo US7427592), T106N/V253N (SEQ ID NO:350; véase por ejemplo US7427592), K143N/N145T (SEQ ID NO:351; US7442524), R315N/V317T (SEQ ID NO:352; US7442524) o K143N/N145T/R315N/V317T (SEQ ID NO:353; US7442524). La mutación Q286R también se puede incorporar en los polipéptidos FVII quiméricos o polipéptidos de fusión FVII o polipéptidos FVII que se modifican de otra manera, tal como mediante l glicoPEGilación (véase por ejemplo el documento WO2007022512, Ghosh *y colaboradores*, (2007) transcripción de la presentación en la Am. Society. Hematol. Meeting, 01 de Diciembre 10 de 2007). En un ejemplo, el reemplazo de aminoácido de la glutamina con una arginina en la posición de aminoácido position que corresponde a posición de aminoácido 286 de un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3 da por resultado un polipéptido FVII con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 118.

Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que contienen la sustitución de aminoácido Q286R por la numeración de FVII maduro (que corresponde a Q143R por la numeración de quimotripsina), en donde los polipéptidos FVII exhiben actividad coagulante incrementada. Estos polipéptidos FVII modificados pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más de posiciones modificadas, en donde una de las composiciones modificadas es la posición de aminoácidos 286. De esta manera, se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificado que contienen dos o más modificaciones, en donde una modificación es la sustitución de aminoácido Q286R (por la numeración de FVII maduro) y el polipéptido FVII modificado exhibe actividad coagulante modificada comparada con un polipéptido FVII no modificado. La mutación Q286R se puede combinar con cualquier otra mutación descrita en este documento o conocida en el campo. Típicamente, el polipéptido modificado resultante muestra actividad coagulante incrementada. Una persona experta en el campo puede determinar la actividad coagulante de un polipéptidos FVII que contiene la modificación Q286R que usa ensayos *in vitro* e *in vivo* bien conocidos en el campo y descritos en este documento. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento incluyen aquellos que contiene la mutación Q286R y también contiene una o más mutaciones que, por ejemplo, incrementa la resistencia a la antitrombina-III, incrementan la activación de FX, incrementan la activación de FIX, incrementan el enlace y/o afinidad a los fosfolípidos, incrementan la afinidad para el factor de tejido,

180

incrementan la actividad intrínseca, incrementan la actividad dependiente de TF, altera la conformación del polipéptido para alterar la zimogenicidad, incrementa la actividad catalítica o coagulante, tal como al cambiar el equilibrio entre las conformaciones FVIIa altamente activas y menos activas en favor de las conformaciones altamente activas, incrementa la resistencia a las proteasas, disminuyen la glicosilación, incrementan la glicosilación, reducen la inmunogenicidad, incrementan la estabilidad, y/o facilitan el enlace del grupo químico.

La actividad coagulante incrementada de los polipéptidos FVII modificados que contienen la sustitución de aminoácidos Q286R puede ser un resultado de un incremento en la actividad catalítica. La actividad catalítica incrementada se puede observar en presencia y/o ausencia del factor de tejido (TF). De esta manera, la actividad catalítica incrementada puede ser dependiente de TF y/o independiente de TF. La actividad catalítica de un polipéptido FVII modificado que contiene la mutación Q286R se puede estimar usando ensayos *in vitro*, tales como los ensayos descritos en los Ejemplos 4 y 7. Estos ensayos pueden determinar la actividad catalítica de un polipéptido FVII modificado para un substrato, tal como factor X, en presencia o ausencia del factor de tejido. Los polipéptidos FVII modificados que contienen las mutaciones Q286R pueden exhibir actividad catalítica incrementada de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en presencia y/o ausencia del factor de tejido comparado con la

181

actividad catalítica de el polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, como se demuestra en el Ejemplo 4, un polipéptido FVIIa que contiene la mutación Q286R (Q143R por la numeración de quimotripsina) como la única modificación puede exhibir actividad catalítica para FX en presencia o ausencia de TF que es aproximadamente dos a cuatro veces mayor que la actividad catalítica exhibida por el FVII de tipo silvestre. En otros ejemplos, un polipéptido FVIIa que contiene las mutaciones Q286R y M298Q pueden exhibir actividad catalítica para FX en presencia de TF que es aproximadamente tres a cuatro veces mayor que la actividad catalítica exhibida por el FVII de tipo silvestre, y puede exhibir actividad catalítica para FX en una ausencia de TF que es aproximadamente siete a veintiséis veces mayor que la actividad catalítica exhibida por el FVII de tipo silvestre.

Ejemplos no limitantes de polipéptidos FVII modificados que contienen dos o más modificaciones, en donde una modificación es la sustitución de aminoácido Q286R (pro la numeración de FVII maduro) y el polipéptido FVII modificado exhibe actividad catalítica incrementada hacia FX en presencia y/o ausencia del factor de tejido comparado con un polipéptido FVII no modificado, expuesto en la Tabla 5 y en el Ejemplo 4, posteriormente. El identificador de secuencia (SEQ ID NO) se identifica en el cual las secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido FVII se exponen. Como se plantea con mayor detalle en la sección D.6, posteriormente, la modificación "Gla Intercambio FIX" implica la supresión del dominio FVII Gla endógeno al suprimir los residuos de aminoácido A1 a Y44

182

(residuo que corresponde al polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3) y la inserción de 45 residuos de aminoácido que corresponden a los residuos de aminoácido Y1 a Y45 del dominio FIX Gla expuesto en SEQ ID NO:83. En algunos ejemplos, el dominio heterólogo en FIX Gla en el polipéptido FVII modificado con "Gla Intercambio FIX" contiene una o más sustituciones de aminoácido en las posiciones de aminoácido que corresponde a M1 9, E40, K43 y/o Q44 del dominio FIX Gla expuesto en SEQ ID NO: 83. Estas sustituciones se indican por llaves (por ejemplo {Gla Intercambio FIX/Q44S}). En casos donde una posición de aminoácido modificada no tiene un número de quimotripsina correspondiente (es decir no está dentro de las posiciones de aminoácido 153 a 406 que corresponde al polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3, y no se expone en la Tabla 1, anterior), la posición se indica en corchetes que usan la numeración de FVII maduro. Por ejemplo, T158N no tiene un número de quimotripsina correspondiente y se expone como T[158]N cuando se refiere a la numeración de quimotripsina.

Tabla 5.

Modificación - numeración de FVII maduro	**Modificación - numeración de quimotripsina**	**SEQ ID NO.**
Gla Intercambio FIX/Q286R	Gla Intercambio FIX/Q143R	131
Q286R/H257A	H117A/Q143R	132
S222A/Q286R	S82A/Q143R	133
Q286R/S222A/H257A	S82A/H117A/Q143R	134
Gla Intercambio FIX/S222A/Q286R	S82A/Gla intercambio FIX/Q143R	135
Gla Intercambio FIX/H257A/Q286R	H117A/Gla intercambio FIX/Q143R	136
Gla Intercambio FIX /S222A/H257A/Q286R	Q143R/S82A/H117A/Gla Intercambio FIX	137
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	138

183

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO.
Q286R/M298Q1K341Q	Q143R/M156Q/K192Q	139
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE	140
S222A/11257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	150
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	144
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V	145
H257S/Q286R	H117S/Q143R	146
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	147
S222A/H257A/Q286R/Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	148
Q286R/H373A	Q143R/H224A	149
Q286R/K341D	Q143R/K192D	151
Q286R/Q366D	QI43R/Q217D	152
Q286R/Q366N	Q143R/Q217N	153
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	155
Q286R/H373F	Q143R/H224F	156
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	157
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	138
T128N/P129A/Q286R	T[128]N/P[129]A/Q143R	279
Gla Intercambio FIX/ T128N/P129A/S222A/Q286R	Gla Intercambio FIX/ T[128]N/P[129]A/S82A/Q143R	285
Gla Intercambio FIX/ S52A/S60A/S222A/Q286R	Gla Intercambio FIX/ S[521A1S[60]A/S82A/Q143R	292
Gla Intercambio FIX/Q286R/M298Q	Gla Intercambio FIX/Q143R/M156Q	141
T128N/P129A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	280
Gla Intercambio FIX/T128N/P 129A/Q286R/M298Q	Gla Intercambio FIX/ T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	286
{Gla Intercambio FIX/E40L}/ Q286R/M298Q	{Gla Intercambio FIX/E[40]L}/ Q143R/M156Q	274
{Gla Intercambio FIX/K43I}/ Q286R/M298Q	{Gla Intercambio FIX/K[43]I}/ Q143R/M156Q	275
{Gla Intercambio FIXIQ44S}/ Q286R/M298Q	{Gla Intercambio FIX/Q[44]S}/ Q143R/M156Q	276
{Gla Intercambio FIX/M19K}/ Q286R/M298Q	{Gla Intercambio FIX/M[19]K}/ Q143R/M156Q	277
S52A/S60A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q143R/M 156Q	293
T128N/P129A/S222A/H257A/Q28 6R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/H117A/ Q143R/M156Q	287
S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R /M298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H1 I7A/Q143R/M156Q	298
T128N/P129A/Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H224F	281

184

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO.
S52A/S60A/Q286R/H373F	S[52]R/H[60]A/Q143R/H224F	296
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/H224F	288
S52A/S60A/Q286R/M298Q/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q/H224F	297
V21D/Q143R/E154V/M156Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	282
Gla Intercambio FIX/S222A/T239V/Q286R	Gla Intercambio FIX/S82A/T99V/Q143R	301
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	302
Gla Intercambio FIX/T239V/Q286R/M298Q	Gla Intercambio FIX/T99V/Q143R/M156Q	304
S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q	303
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	305
T239V/Q286R/M298Q/H373F	T99V/Q143R/M156Q/H224F	306
T239L/Q286R	T991/Q143R	308
Gla intercambio FIX/S222A/T2391/Q286R	Gla Intercambio FIX/S82A/T991/Q143R	310
T239L/Q286R/M298Q	T991/Q143R/M156Q	311
Gla Intercambio FIX/T2391/Q286R/M298Q	Gla Intercambio FIX/T991/Q143R/M156Q	313
S222A/T2391/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T991/H17143R/M156Q	312
T2391/Q286R/H373F	T991/Q143R/H224F	314
T239V/Q286R	T99V/Q143R	299
T2391/Q286R/M298Q/H373F	T991/Q143R/M156Q/H224F	315
H257S/Q286R/M298Q	H117S/Q143R/M156Q	322
Gla Intercambio FIX/Q286R/S222A/H257S	Gla Intercambio FIX/Q143R/S82A/H117S	321
S222A/H257S/Q286R/M298Q	S82A/H117S/Q143R/M156Q	324
H257S/Q286R/M298Q/H373F	H117S/Q143R/M156Q/H224F	325
S222A/Q286R/M298Q/H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	326
Gla Intercambio FIX/S222A/Q286R/M298Q/H373F	Gla Intercambio FIX S82A/Q143R/M156Q/H224F	318
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	328
Gla Intercambio FIX/S222A/Q286R/M298Q	Gla Intercambio FIX S82A/Q143R/M156Q	317
Gla Intercambio FIX/S222A/Q286R/H373F	Gla Intercambio FIX/S82A/Q143R/H224F	316
H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	321
T128N/P129A/A175S/Q286R/M29	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/	337

185

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO.
8Q	M156	
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q	338
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	339
A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	340
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156Q/H224F	341
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F	A[1221N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q/H224F	342
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F	V21D/Q143R/E154V/M156Q/H224F	320
{Gla Intercambio FIX/K431}/T128N/P129A/Q286R/M298Q	{Gla Intercambio FIX/K[43]I}/T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	355
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N	356
{Gla Intercambio FIX/K431}/Q286R/M298Q/Q366N	{Gla Intercambio FIX/K[43]I}/Q143R/M156QQ217N	357
{Gla Intercambio FIX/K431}/T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N	{Gla Intercambio FIX/K[43]1}/T[128]N/P[129]A/Q143R/M156QQ217N	358
V158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	360
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N1H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N/H224F	364
T239V/Q286R/M298Q/Q366N	T99V/Q143R/M156Q/Q217N	365
T2391/Q286R/M298Q/Q366N	T9911Q143R/M156Q/Q217N	366
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q	367
T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q	368
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129JA/T99V/Q143R/M156Q1H224F	369
T128N/P129A/T2391/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/T99L/Q143R/M156Q	370
T128N/P129A/T239L/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/T991/Q143R/M156Q/H224F	371

Un polipéptido FVII que contiene la mutación Q286R por la numeración de FVII maduro también puede exhibir

186

000156

resistencia incrementada a AT-III. La resistencia incrementada a AT-III puede ser un resultado de una velocidad disminuida de inhibición por AT-III o enlace disminuido a AT-III bajo condiciones especificadas, tal como después de la inyección en un animal o paciente. La resistencia a AT-III se puede demostrar al medir la segunda constante de velocidad de orden para la inhibición de los polipéptidos FVIIa de tipo silvestre y variantes. Otros métodos *in vitro*, tales como los ensayo BIAcore[MR], también se pueden usar. Los polipéptidos FVII modificados pueden exhibir resistencia incrementada a los efectos inhibidores de AT-III comparados con un polipéptido FVII no modificado, el cual se puede estimar en los ensayos *in vitro* tales como aquellos descritos en el Ejemplo 5. Los polipéptidos FVII modificados que contienen las mutaciones Q286R pueden exhibir resistencia incrementada a AT-III de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparados con la resistencia a AT-III del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, como se demuestra en el Ejemplo 5 posteriormente, un polipéptido FVIIa que contiene la mutación Q286R (Q143R por la numeración de quimotripsina) puede exhibir actividad catalítica para FX en presencia de AT-III y la ausencia de TF que es dos a cuatro veces o más grande que la actividad catalítica exhibida por el FVII de tipo silvestre. De esta manera, el polipéptido Q286R FVII modificado puede exhibir un incremento en la resistencia a AT-III de aproximadamente 200% a 400% de aquella a un

187

polipéptido FVII no modificado.

La actividad catalítica incrementada y la resistencia incrementada a AT-III pueden manifestarse como actividad coagulante incrementada en presencia y/o ausencia de TF. Estas actividades se pueden estimar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, tal como mediante la administración a un sujeto humano o animal. La actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados que contiene la mutación Q286R se puede incrementar por lo menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparado con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado de tipo silvestre ya sea *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, el Ejemplo 6.B.2 muestra que un polipéptido FVIIa que contiene la mutación Q286R (Q143R por la numeración de quimotripsina) exhibe actividad de coagulación en un modelo hemorrágico de ratón que es mayor (aproximadamente 2 veces) que la actividad de coagulación exhibida por un polipéptido FVII de tipo silvestre (por ejemplo FVII NovoSeven^{MR}). El polipéptido FVIIa que contiene las mutaciones Q286R y M298Q (Q143R y M156Q, respectivamente, por la numeración de quimotripsina) exhiben actividad de coagulación aún mayor.

ii. Otras mutaciones en la posición 286

La glutamina en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 286 del polipéptido FVII expuesto en SEQ ID NO: 3 se puede reemplazar con un aminoácido diferente a un aminoácido básico (es decir diferente a arginina, histidina o lisina). Estas sustituciones pueden

188

alterar la conformación del orificio de oxianión, por ejemplo, dando por resultado una conformación que incrementa la actividad catalítica del polipéptido FVII modificado comparado con un polipéptido FVII de tipo silvestre. Los polipéptidos FVII modificado que tienen una conformación de orificio de oxianión alterado puede exhibir actividad catalítica incrementada de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con la actividad catalítica del polipéptido FVII no modificado de tipo silvestre cuando se mide usando ya sea ensayos *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro*.

La Tabla 6 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares en Q286 diferente al reemplazo con arginina, que corresponde a las posiciones de aminoácido de un polipéptido FVII maduro como se expone en SEQ ID NO:3. Como se observa, estos polipéptidos FVII se diseñan para cambiar la conservación del orificio de oxianión a una conformación más efectiva, y por lo tanto tiene actividad coagulante incrementada. Con referencia a estas mutaciones, el primer aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido que se reemplaza, el número corresponde a la posición en la secuencia de polipéptido FVII maduro con referencia a SEQ ID NO: 3, y el segundo aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido seleccionado que reemplaza el primer aminoácido en esta posición. Las posiciones de aminoácidos para la mutación también son referidas por el esquema de numeración de

189

quimotripsina. En la Tabla 6 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el cual la secuencia de aminoácidos ejemplares del polipéptido FVII modificado se expone.

Tabla 6.

Modificación - numeración de FVII maduro	**Modificación - numeración de quimotripsina**	**SEQ ID NO.**
Q286N	Q143N	113
Q286E	Q143E	114
Q286D	Q143D	115
Q286S	Q143S	116
Q286T	Q143T	117
Q286A	Q143A	120
Q286V	Q143V	121
Q286M	Q143M	122
Q286L	Q143L	123
Q286Y	Q143Y	124
Q286G	Q143G	125
Q286F	Q143F	126
Q2861	Q1431	127
Q286P	Q143P	128
Q286W	Q143W	130

Los polipéptidos FVII modificados que tienen una conformación de orificio de oxianión alterado pueden exhibir actividad catalítica incrementada de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con la actividad catalítica del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre cuando es mide usando ya sea ensayos *in vivo, ex*

190

vivo, o *in vitro*. En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados que tienen una conformación de orificio de oxianión alterado también pueden exhibir resistencia incrementada a inhibidores de proteasa endógenos (es decir, velocidad disminuida de inhibición por o afinidad disminuida para inhibidores) tal como TFPI o AT-III por aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con la velocidad de inhibición por o afinidad para los inhibidores endógeno exhibidos por el polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro*. La actividad y/o resistencia catalítica incrementada a los inhibidores endógenos tal como resistencia a AT-III de estos polipéptidos FVII modificados también se puede manifestar como actividad de coagulación incrementada, duración de la actividad de coagulación, iniciación más rápida de la actividad de coagulación y/o índice terapéutico mejorado. Por ejemplo, la actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados se puede incrementar por lo menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro*.

2. Resistencia incrementada a AT-III

La antitrombina III (también conocida como antitrombina o AT-III) es una serpina anticoagulante importante (inhibidor de serina proteasa). La AT-III se sintetiza como una proteína precursora que contiene 464 residuos de aminoácido (SEQ ID NO:

122). En el curso de la secreción de un péptido de señal de 32 residuos se escinde para generar una antitrombina humana madura de 432 aminoácidos (SEQ ID NO: 123). La glicoproteína 58 kDa AT-III circula en la sangre y funciona como un inhibidor de serina proteasa (serpina) para inhibir una gran variedad de serina proteasas del sistema de coagulación. Los objetivos principales de AT-III son la trombina y el factor Xa, aunque AT-III también se ha mostrado que inhibe las actividades de FIXa, FXIa, FXIIa y, a un grado menor, FVIIa. La acción de AT-III se mejora grandemente por los glicosaminoglicanos, tal como el sulfato de heparano de origen natural o las diversas heparinas derivadas de tejidos que se usan ampliamente como anticoagulantes en la práctica clínica. La AT-III se enlaza de una manera altamente específica a una secuencia de pentasacáridos única en la heparina que induce un cambio conformacional en el bucle central reactivo. En esta conformación, el bucle central reactivo de AT-III puede interactuar más eficientemente con el sitio reactivo de la serina proteasa y efectuar la inhibición.

La AT-III no es normalmente inhibidora para el FVIIa plasmático libre, aún en presencia de la heparina, probablemente debido a la conformación similar al zimógeno de FVIIa que evita la interacción eficiente con AT-III. Los efectos inhibidores en AT-III se incrementan, sin embargo, una vez que el FVIIa se forma en complejo con TF. El enlace de AT-III al complejo TF/FVIIa puede liberar FVIIa de TF y lo mantiene en un complejo inactivo con AT-III. La afinidad incrementada de AT-III para el FVIIa enlazado con TF comparado

con FVIIa solo refleja presumiblemente la maduración del sitio activo de FVIIa cuando se forma en complejo con TF, haciéndolo por lo tanto susceptible al enlace de AT-III (Rao *y colaboradores* (1993) Blood 81:2600- 2607). De esta manera, el impacto de AT-III sobre FVIIa es proporcionar a la actividad intrínseca de la molécula FVIIa misma, a menos que las mutaciones se hayan agregado al polipéptido FVIIa que median la resistencia a AT-III. Mientras que FVIIa retiene su conformación similar a zimógeno, la AT-III tiene poco efecto. Sin embargo, si FVIIa cambia la conformación a una forma más activa, tal como al enlazar TF, o mediante modificaciones *in vitro* específicas, la inhibición de AT-III triple se incrementa significativamente. Los polipéptidos FVIIa que se modifican para tener actividad intrínseca incrementada exhiben frecuentemente incremento simultáneo en la susceptibilidad a la inhibición de AT-III. Por ejemplo, la modificación de uno o más aminoácidos en la bolsa de activación de FVIIa, tal como mediante reemplazos de aminoácido que corresponden a K337A, L305V, M298Q, V158D y sustituciones de E296V (relativos con la secuencia FVII maduro expuesta en SEQ ID NO:3), da por resultado la sensibilidad incrementada del polipéptido FVIIa a AT-III, inhibiendo en consecuencia la actividad de FVIIa por hasta 90% (Persson *y colaboradores* (2001) PNAS 98:13583-13588). En otro ejemplo, la inducción de una conformación más similar a zimógeno por la modificación de los aminoácidos implicados en la α-hélice de FVIIa, mientras que incrementa la actividad de la proteína FVIIa modificada, también incrementa susceptibilidad a AT-III (Persson *y colaboradores* (2004)

193

Biochem J 379:497-503).

Modificaciones ejemplares para efectuar la resistencia incrementada a AT-III

Se pueden hacer modificaciones para un polipéptido FVII que incremente su resistencia a AT-III. Generalmente, tales polipéptidos FVII modificados retienen por lo menos una actividad de un polipéptido FVII. Típicamente, estas modificaciones incluyen una o más sustituciones de aminoácidos en cualquier posición del polipéptido FVII que se implican en interacción de FVIIa con AT-III. Estas modificaciones pueden, por ejemplo, dar por resultado el enlace reducido del FVII modificado a AT-III. Los polipéptidos FVII modificados son por lo tanto resistentes a los efectos naturalmente inhibidores de AT-III con respecto a la iniciación de la coagulación. Cuando se evalúan en un ensayo *in vitro* apropiado, o *in vivo*, tal como después de la administración a un sujeto como un agente terapéutico procoagulante, los polipéptidos FVII resistentes a AT-III modificados exhiben actividad coagulante incrementada como son comparados con los polipéptidos FVII no modificados.

Como se describe en este documento posteriormente, una persona experta en el campo puede diseñar empírica o racionalmente polipéptidos FVII modificados que exhiban resistencia incrementada a AT-III. Estos polipéptidos FVII modificados se pueden someter a prueba en ensayos conocidos por una persona experta en el campo para determinar si estos polipéptidos FVII modificados exhiben resistencia incrementada a AT-III. Por ejemplo, estos polipéptidos AT-III modificados también se pueden someter a prueba para enlazarse a AT-III.

194

Generalmente, un polipéptido FVII modificado que tiene resistencia incrementada a AT-III exhibirá enlace disminuido y/o afinidad disminuida para AT-III. Típicamente, estos ensayos se realizan sobre una forma de dos cadenas de FVII, tal como la forma actividad de FVII (FVIIa). Además, los ensayos para determinar los efectos de AT-III se realizan generalmente en presencia de heparina y la presencia del factor de tejido, aunque estos ensayos también se pueden realizar en ausencia de uno o ambos cofactores.

Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que exhiben resistencia incrementada a AT-III. La resistencia a la inhibición por ATIII es relevante tanto en presencia y ausencia de TF. Las variantes del polipéptido FVII proporcionadas en este documento se han modificado en una o más de las posiciones de aminoácido 239, 931, 366 y 373 (que corresponde a las posiciones de aminoácido 99, 170i, 217 y 224, respectivamente, por la numeración de quimotripsina). Estos residuos de aminoácido se pueden modificar tal como mediante el reemplazo, en supresión o sustitución de aminoácidos. Los residuos identificados se pueden reemplazar o sustituir con cualquier otro aminoácido. Alternativamente, las inserciones de aminoácido se pueden usar para alterar la conformación de un residuo de aminoácido objetivo o la estructura de proteína en la vecindad de un residuo de aminoácido objetivo.

Cualquier residuo de aminoácido se puede sustituir para el residuo de aminoácido endógeno en las posiciones identificadas. Típicamente, se selecciona el aminoácido de reemplaza tal que interfiere con la interacción entre FVII y AT-III. En algunos

000165

ejemplos, el residuo de treonina en la posición 239 (que corresponde a la posición 99 por la numeración de quimotripsina) se reemplaza con una serina (Ser, S), asparagina (Asn, N), glutamina (Gln, Q), valina (Val, V), leucina (Leu, L), histidina (His, H), o isoleucina (He, I). En otros ejemplos, la prolina en la posición 321 (que corresponde a la posición 170i por la numeración de quimotripsina) se reemplaza con una lisina (Lys, K), ácido glutámico (Glu, E), serina (Ser, S), o tirosina (Tyr, Y). En ejemplos adicionales, la glutamina en la posición 366 (que corresponde a la posición 217 por la numeración de quimotripsina) se reemplaza con una asparagina (Asn, N), ácido aspártico (Asp, D), ácido glutámico (Glu, E), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), lisina (Lys, K), o valina (Val, V). En otros ejemplos, la histidina en la posición 373 (que corresponde a la posición 224 por la numeración de quimotripsina) se reemplaza con un ácido aspártico (Asp, D), ácido glutámico (Glu, E), serina (Ser, S), fenilalanina (Phe, F) o alanina (Ala, A). En una modalidad adicional, se pueden generar mutantes de combinación. Incluidos entre estos mutantes de combinación son aquellos que tienen dos o más mutaciones de los residuos T239, P321, Q366 y H373 (que corresponden a T99, P 170i, Q217 y H224, respectivamente, por la numeración de quimotripsina). Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede poseer sustituciones de aminoácidos en 2, 3, 4 o 5 de las posiciones incrementadas. Por consiguiente, un polipéptido modificado puede exhibir 1, 2, 3, 4 o 5 mutaciones que pueden dar por resultado resistencia incrementada del polipéptido FVII modificado a los efectos inhibidores de AT-III. Por ejemplo, un

000166

polipéptido FVII se puede modificar en la posición de aminoácido 366 y la posición de aminoácido 373. En algún ejemplo, las posiciones se modifican por el reemplazo de aminoácidos tal como, por ejemplo, el reemplazo de la glutamina en la posición 366 con un ácido aspártico, y el reemplazo de la histidina en la posición 373 con un ácido glutámico.

La Tabla 7 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares en los residuos identificados, que corresponden a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FVII maduro como se expone en SEQ ID NO:3. Se incluyen entre estos mutaciones de combinación ejemplares. Como se observa, estos polipéptidos FVII se diseñan para incrementar la resistencia a AT-III y por lo tanto tienen actividad coagulante incrementada. En referencia con estas mutaciones, el primer aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido que se reemplaza, el número corresponde a la posición en la secuencia de polipéptido FVII maduro con referencia a SEQ ID NO: 3, y el segundo aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido seleccionado que reemplaza el primer aminoácido en esa posición. Las posiciones de aminoácidos para la mutación también son referidas mediante el esquema de numeración de quimotripsina. En la Tabla 7 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el cual las secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido FVII modificado se exponen.

Tabla 7.

Modificación - numeración de	**Modificación - numeración de**	**SEQ ID NO.**

197

FVII maduro	quimotripsina	
T239S	T99S	159
T239N	T99N	160
T239Q	T99Q	161
T239V	T99V	162
T239L	T99L	163
T239H	T99H	164
T2391	T991	165
P321K	P17OiK	166
P321E	P17OiE	167
P321Y	P17OiY	168
P321S	P17OiS	169
Q366D	Q217D	170
Q366E	Q217E	171
Q366N	Q217N	172
Q366T	Q217T	173
Q366S	Q217S	174
Q366V	Q217V	175
Q3661	Q2171	176
Q366L	Q217L	177
Q366M	Q217M	178
H373D	H224D	179
H373E	H224E	180
H373S	H224S	181
H373F	H224F	182
H373A	H224A	183
Q366D/H373E	Q217D/H224E	184
Q366V/H373V	Q217V/H224V	185
Q366V/H373L	Q217V/H224L	186
Q366V/H3731	Q217V/H2241	187

Los polipéptidos FVII modificados que tienen resistencia incrementada para AT-III pueden exhibir una reducción para el grado de inhibición bajo condiciones especificadas o en la segunda constante de velocidad de orden para la inhibición por AT-III mediante por lo menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%,

198

000168

5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con el grado de inhibición o la segunda constante de velocidad de orden para la inhibición del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo* o *in vitro*. De esta manera, los polipéptidos FVII modificados pueden exhibir resistencia incrementada a AT-III que es por lo menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más de la resistencia exhibida por un polipéptido FVII no modificado. La resistencia incrementada a AT-III por estos polipéptidos FVII modificados también se pueden manifestar por como actividad de coagulación incrementada, duración de la actividad de coagulación y/o índice terapéutico mejorado en presencia de AT-III. La actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificado con AT-III se puede incrementar mediante por lo menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparado con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo* o *in vitro*.

3. Resistencia incrementada para la inhibición por Zn^{2+}

La actividad amidolítica de FVIIa se regula por las alteraciones alostéricas inducidas por el enlace de iones de calcio y el factor de tejido (TF). El FVII libre existe típicamente en una conformación inactiva. El enlace a Ca^{2+} y TF induce un cambio en la conformación y la actividad amidolítica incrementada (Pederson *y colaboradores*, (1990) J Biol. Chem.

000169

265:16786-16793). En contraste, el enlace de iones de zinc a FVIIa se ha mostrado que tiene un efecto inhibidor sobre la actividad. El enlace de Zn^{2+} a FVIIa da por resultado actividad amidolítica disminuida y afinidad reducida para TF. Los estudios indican que Ca^{2+} y Zn^{2+} compiten para enlazarse a FVIIa, tal que en presencia de Ca^{2+}, el efecto inhibidor de Zn^{2+} se reduce. Adicionalmente, FVIIa enlazado a TF es menos susceptible a la inhibición del zinc.

Además de los sitios de enlace Zn^{2+} en el dominio Gla, en enlace del cual no afecta la actividad amidolítica del FVIIa, se han cartografiado dos enlaces de Zn^{2+} al dominio de proteasa de FVII (Petersen *y colaboradores*, (2000) Protein Sci. 9:859-866, Bajaj *y colaboradores*, (2006) J. Biol. Chem. 281:24873-24888). La cartografía de estos sitios de enlace en el dominio de proteasa indica que el primer sitio de enlace Zn^{2+} implica las cadenas laterales de los residuos de aminoácido H216, E220 y S222 (H76, E80 y S82 por la numeración de quimotripsina), y el segundo sitio de enlace Zn^{2+} implica las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos H257, D219 y K161 (H117, D79 y K24 por la numeración de quimotripsina). El Zn^{2+} podía, por lo tanto, tener una función fisiológica en regular la homeostasis como un inhibidor de FVII. Se ha postulado que estos efectos inhibidores ocurren como un resultado de un incremento en la concentración de Zn^{2+} en el sitio del coágulo después de la activación de las plaquetas (Bajaj *y colaboradores*, (2006) J. Biol. Chem. 281:24873-24888). Las plaquetas almacenan grandes cantidades de Zn^{2+} en citoplasma y α-gránulos, los cuales se liberan en la activación de las plaquetas. Esto podría

incrementar la concentración local de Zn^{2+} lo cual a su vez podría inhibir la actividad de FVIIa y el enlace de FVIIa a TF.

Modificaciones ejemplares para incrementar la resistencia a la inhibición por Zn^{2+}

Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que exhiben resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+}. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la mutación de uno o más residuos en FVII implicados en interacción y enlace con Zn^{2+} para reducir o prevenir este enlace, haciendo en consecuencia los polipéptidos FVII modificados resistentes a los efectos inhibidores de Zn^{2+} con respecto a la actividad catalítica y al enlace de TF. Cuando se evalúa en un ensayo *in vitro* apropiado, o *in vivo*, tal como después de la administración a un sujeto como un agente terapéutico procoagulante, los polipéptidos FVII modificados pueden exhibir actividad coagulante incrementada como son comparados con los polipéptidos FVII no modificados.

Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que tienen una o más mutaciones en los residuos que se pueden implicar en el enlace de Zn^{2+} en el dominio de proteasa. Estos residuos incluyen, pero no se limitan a, K161, H216, D219, E220, S222 y H257, con la numeración relativa con las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3 (que corresponde a K24, H76, D79, E80, S82 y H117, respectivamente, por la numeración de quimotripsina). En algunos ejemplos, uno o más de los residuos de aminoácido H216, S222 y H257 (que corresponden a H76, S82 y H117, respectivamente, por la numeración de quimotripsina) se

modifican, tal como mediante el reemplazo o supresión de aminoácidos. Cualquier residuo de aminoácido se puede usar para reemplazar el residuo endógeno en las posiciones identificadas. Por ejemplo, se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados en los cuales la histidina en la posición de aminoácidos 216 se reemplaza con un residuo de serina, alanina, lisina o arginina. En otro ejemplo en la posición de aminoácidos 222 se reemplaza con un residuo de alanina o lisina, o la histidina en la posición 257 se reemplaza con un residuo de alanina o serina. En una modalidad adicional, la lisina en la posición 161 se reemplaza con un residuo de serina, alanina o valina. Las modificaciones también incluyen inserciones de aminoácidos en o cerca de las posiciones de aminoácidos identificadas por ser implicadas en el enlace de Zn^{2+}. Estas inserciones pueden interrumpir el sito de enlace de Zn^{2+}, dando por resultado un polipéptido FVII modificado con enlace disminuido a Zn^{2+}.

Los mutantes de combinación en los cuales los reemplazos de aminoácidos se hacen en más de uno de los residuos identificados anteriormente en un polipéptido FVII también se pueden generar. Incluidos entre estos mutantes de combinación son aquellos que tienen dos o más mutaciones de los residuos K161, H216, D219, E220, S222 y H257 (que corresponde a K24, H76, D79, E80, S82 y H117, respectivamente, por la numeración de quimotripsina). Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede poseer sustituciones de aminoácidos en 2, 3, 4, 5 o 6 de las posiciones identificadas. Por consiguiente, un polipéptido modificado puede exhibir 1, 2, 3, 4, 5 o 6 mutaciones que

202

pueden dar por resultado una capacidad disminuida del polipéptido FVII modificado de enlazarse a Zn^{2+}. Por ejemplo, un polipéptido FVII se puede modificar por el reemplazo de aminoácido de la serina en la posición 222 con una lisina, y la histidina en la posición 257 con un residuo de alanina.

Los polipéptidos FVII modificados que tienen resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+} pueden exhibir un incremento por lo menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con la resistencia del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo* o *in vitro*. Una reducción en el enlace de Zn^{2+} y, por lo tanto, la resistencia incrementada con los efectos inhibidores de Zn^{2+}, por estos polipéptidos FVII modificados también se puede manifestar como una actividad de coagulación incrementada en presencia de Zn^{2+}. La actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados se puede incrementar por los menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo* o *in vitro*.

La Tabla 8 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares en los residuos identificados, que corresponden a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FVII maduro como se expone en SEQ ID NO:3. Incluido entre éstos son las mutaciones de combinaciones ejemplares. Como se observa, estos polipéptidos FVII se diseñan

203

para exhibir una capacidad reducida de enlazarse a Zn^{2+} y, por lo tanto, resistencia incrementada contra los efectos inhibidores de Zn^{2+}. De esta manera, el polipéptido FVII modificado puede tener actividad coagulante incrementada. En referencia con estas mutaciones, el primer aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido que se reemplaza, el número corresponde a la posición en la secuencia del polipéptido FVII maduro con referencia a SEQ ID NO: 3, y el segundo aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido seleccionado que reemplaza el primer aminoácido en esa posición. Las posiciones de aminoácidos para la mutación también se refieren mediante el esquema de numeración de quimotripsina. En la Tabla 8 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el cual las secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido FVII modificado se exponen.

Tabla 8.

Modificación - numeración de FVII maduro	**Modificación - numeración de quimotripsina**	**SEQ ID NO.**
K161S	K24S	188
K161A	K24A	189
K161V	K24V	190
H216S	H76S	191
H216A	H76A	192
H216K	H76K	193
H216R	H76R	194
S222A	S82A	195
S222K	S82K	196
S222V	S82V	197

S222N	S82N	198
S222E	S82E	199
S222D	S82D	200
H257A	H117A	201
H257S	H117S	202
S222K/H257A	S82K/H117A	203
H216A/H257A	H76A/H117A	204
H216A/S222A	H76A1S82A	205

4. Glicosilación alterada

Las propiedades y actividades de una proteína se pueden alterar al modular el grado, nivel y/o tipo de glicosilación. Por ejemplo, la glicosilación puede incrementar la vida media del suero de los polipéptidos al incrementar la estabilidad, solubilidad, y al reducir la inmunogenicidad de una proteína. La glicosilación puede incrementar la estabilidad de las proteínas al reducir al proteólisis de la proteína y puede proteger la proteína de la degradación térmica, exposición a los agentes desnaturalizantes, daño por los radicales libres de oxígeno, y cambios en el pH. La glicosilación también puede permitir que la proteína objetivo evada los mecanismos de eliminación que pueden implicar el enlace a otras proteínas, incluyendo los receptores de la superficie celular. Las porciones de carbohidratos que contienen ácido siálico pueden afectar la solubilidad de una proteína. Las porciones de ácido siálico son altamente hidrofílicas y pueden proteger a los residuos hidrofóbicos de la proteína objetivo. Esto disminuye la agregación y precipitación de la proteína objetivo. La agregación disminuida también ayuda en la prevención de la respuesta inmune contra la proteína objetivo. Los carbohidratos

205

pueden proteger adicionalmente las secuencias inmunogénicas del sistema inmunitario. El volumen de espacio ocupado por las porciones de carbohidratos puede disminuir el área superficial disponible que se examina por el sistema inmunitario. Estas propiedades conducen a la reducción en la inmunogenicidad de la proteína objetivo.

Los sitios de glicosilación proporcionan un sitio para la unión de monosacáridos y oligosacáridos a un péptido por la vía de un enlace glicosídico tal que cuando el polipéptido se produce en una célula eucariótica capaz de la glicosilación, se glicosila. Los dos tipos principales de glicosilación son la glicosilación enlazada con N donde las unidades de azúcar se unen por la vía del nitrógeno de amida de un residuo de asparagina, y la glicosilación enlazada con O, donde las unidades de azúcar se unen por la vía del grupo hidroxilo de los residuos de serina, treonina, hidroxilisina o hidroxiprolina. Otras formas más menores de enlaces glicosídicos incluyen el enlace S a cisteína y el enlace C a triptófano. La glicosilación enlazada con N ocurre en las asparaginas en la secuencia de consenso -Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys donde Xaa no es prolina. No se conoce motivo para la O-glicosilación, aunque la O-glicosilación es más probable en las secuencias con una alta producción de residuos de serina, treonina y prolina. La presencia de un sitio de glicosilación potencial sin embargo, no asegura que el sitio se glicosilará durante el procesamiento postraduccional en el ER. Adicionalmente, el nivel de glicosilación puede variar en un sitio proporcionado, y un sitio puede tener muchas estructuras

206

de glicano diferentes. Existen cuatro sitios de glicosilación de origen natural en FVII; dos sitios de N-glicosilación en N145 y N322, y dos sitios de O-glicosilación en S52 y S60, que corresponde a las posiciones de aminoácido en polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3.

Modificaciones ejemplares para alterar la glicosilación

Se proporcionan en este documento polipéptido FVII que se han modificado al alterar el nivel y/o tipo de glicosilación como es comparado con un polipéptido FVII no modificado. La glicosilación se puede incrementar o disminuir comparada con el FVII no modificado. En algunos casos, el nivel de glicosilación se incrementa, dando por resultado un polipéptido FVII hiperglicosilado. Estos se puede lograr por ejemplo, mediante la incorporación de por lo menos un sitio de glicosilación no nativo no encontrado en polipéptido FVII no modificado al cual se enlaza una porción de carbohidrato. Los polipéptido FVII hiperglicosilados también se pueden generar por el enlace de una porción de carbohidrato a por lo menos un sitio de glicosilación nativo encontrado pero no glicosilado en el polipéptido FVII no modificado. En otros ejemplos, el nivel del glicosilación en un polipéptido FVII modificado se disminuye comparado con un polipéptido FVII no modificado. Esto se puede lograr al eliminar uno o más sitios de glicosilación nativos, tal como mediante el reemplazo o supresión de aminoácidos. Uno o más de los residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 52, 60, 145 y 322 que corresponde al polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3 se pueden suprimir o se pueden reemplazar con un residuo de aminoácidos que no se puede

enlazar a las porciones de carbohidrato. Por ejemplo, los residuos de serina en las posiciones 52 y/o 60 se pueden reemplazar con un residuo de alanina, eliminando en consecuencia uno o ambos de los sitios de O-glicosilación nativos. De esta manera, los sitios de glicosilación en un polipéptido FVII se pueden introducir, alterar, eliminar o rearreglar.

Un polipéptido FVII se puede modificar en una o más posiciones para alterar la glicosilación del polipéptido. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento que han al alterado la glicosilación comparados con un polipéptido FVII no modificado pueden tener ninguna glicosilación, glicosilación enlazada con O, glicosilación enlazada con N, y/o una combinación de los mismos. En algunos ejemplos, un polipéptido FVII modificado incluye 1, 2, 3, 4, 5 o más porciones de carbohidrato, cada una enlazada con diferentes sitios de glicosilación. Los sitios de glicosilación pueden ser un sitio de glicosilación nativo y/o un sitio de glicosilación no nativo. En algunos ejemplos, el polipéptido FVII modificado se glicosila en más de un sitio de glicosilación no nativo. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado se puede modificar para introducir 1, 2, 3, 4, 5 o más de sitios de glicosilación no nativo.

Los sitios de glicosilación no nativos se pueden introducir mediante el reemplazo de aminoácidos. Se pueden crear sitios de O-glicosilación, por ejemplo, mediante el reemplazo de aminoácidos de un residuo nativo con una serina o treonina. Los sitios de N-glicosilación se pueden crear al

208

establecer el motivo Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, donde Xaa no es prolina. La creación de esta secuencia consenso por la modificación de aminoácidos podría implicar el reemplazo de un residuo de aminoácido nativo con una asparagina, el reemplazo de un residuo de aminoácido nativo con una serina, treonina o cisteína, o el reemplazo de un resido de aminoácido nativo con un reemplazo de asparagina y aminoácido del residuo nativo con una serina, treonina o cisteína. Por ejemplo, la lisina en la posición 109 (basada en la numeración de FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3) se puede reemplazar con una asparagina para crear un nuevo motivo Asn-Xaa-Ser en el dominio EGF1 y un nuevo sitio de N-glicosilación en la posición de aminoácidos 109. En otro ejemplo, la alanina en la posición 292 se reemplaza con una asparagina y la posición de alanina 294 se reemplaza con una serina para crear un nuevo motivo Asn-Xaa-Ser y un nuevo sitio de N- glicosilación en la posición de aminoácidos 292. En un ejemplo adicional, la alanina en la posición 175 se reemplaza con una serina para crear un nuevo motivo Asn-Xaa-Ser en las posiciones de aminoácidos 173-175 con base en la numeración de un FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3, y un nuevo sitio de N-glicosilación en la posición de aminoácidos 173. Los sitios de glicosilación no nativos se pueden crear en cualquier región en el polipéptido FVII. Por ejemplo, uno o más sitios de glicosilación se pueden introducir en el dominio EGF1, el cual corresponde a las posiciones de aminoácido 46-82 del polipéptido FVII maduro en SEQ ID NO: 3. En otros ejemplos, los sitios de glicosilación no nativos se introducen en la región de dominio de proteasa del polipéptido FVII, o en las

209

posiciones que pueden asociase con la región de dominio de la proteasa en el plegamiento de la proteína.

Los sitios de glicosilación nativos se pueden modificar para prevenir la glicosilación o mejorar o disminuir la glicosilación, mientras que otras posiciones en el polipéptido FVII se pueden modificar para introducir sitios de glicosilación no nativos. En algunos ejemplos, el contenido de carbohidratos del polipéptido FVII se puede modificar. Por ejemplo, la posición de número, resistencia de enlace, estructura y composición de los enlaces de carbohidratos (es decir, estructura de los carbohidratos con base en la naturaleza de los enlaces glicosídicos o ramificaciones de carbohidrato) de las porciones de carbohidratos agregadas al polipéptido FVII se pueden alterar.

Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento que han alterado la glicosilación retienen por lo menos una actividad de FVII. Típicamente, los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento que han alterado la glicosilación exhiben actividad coagulante incrementada comparada con un FVII no modificado. En algunos ejemplos, el nivel de glicosilación de un polipéptido FVII se incrementa. El nivel de glicosilación se puede incrementar por lo menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparado con el nivel de glicosilación del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre. En otros ejemplos, el nivel de glicosilación se disminuye. El nivel de glicosilación se puede disminuir por lo menos aproximadamente

1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparado con el nivel de glicosilación del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre. Los niveles de glicosilación alterados o cambios en el tipo de glicosilación presentes en el polipéptido FVII modificado comparado con un polipéptido FVII no modificado se pueden manifestar como actividad de coagulación incrementada. La actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados con glicosilación alterada se pueden incrementar por lo menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo* o *in vitro*.

La Tabla 9 proporciona ejemplos no limitantes de los reemplazos de aminoácidos ejemplares, que corresponden a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FVII maduro como se expone en SEQ ID NO:3, que se incluyen en un polipéptido FVII modificado para alterar los niveles de glicosilación al agregar o al eliminar sitios de glicosilación. Los reemplazas de aminoácidos ejemplares pueden crear sitios de glicosilación no nativos o eliminar sitios de glicosilación nativos. En algunos casos, se requieren dos reemplazos de aminoácidos para crear un nuevo sitio de glicosilación. También se incluyen en la Tabla 9 mutaciones de combinación ejemplares que crean más de un nuevo sitio de glicosilación nativo en el polipéptido FVII. Como se observa anteriormente, los cambios en los niveles de glicosilación pueden, por ejemplo, incrementar la vida media.

21

De esta manera, los polipéptidos FVII modificados pueden tener actividad coagulante incrementada. En referencia a estas mutaciones, un primer aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido que se reemplaza, el número corresponde a la posición en la secuencia de polipéptido FVII maduro con referencia a SEQ ID NO: 3, y el segundo aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido seleccionado que reemplaza el primer aminoácido en esa posición. Las posiciones de aminoácidos para la mutación también son referidas por el esquema de numeración de quimotripsina donde es apropiado. En los casos donde una posición de aminoácidos modificada no tiene un número de quimotripsina correspondiente (es decir, no está dentro de las posiciones de aminoácidos 153 a 406 que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3, y no se expone en la Tabla 1, anterior), la posición se indica en corchetes usando la numeración de FVII. Por ejemplo, A51N no tiene un número de quimotripsina correspondiente y se expone como A[51]N cuando se refiere a la numeración de quimotripsina. En la Tabla 9 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el cual las secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido FVII modificado se exponen. También se identifica en la Tabla 9 cualquiera de los nuevos sitio(s) de glicosilación nativo(s) generados por la modificación(es).

Tabla 9.

Modificación (es) - numeración de FVII maduro	**Modificación (es) - numeración de quimotripsina**	Sitio de glicosila-ción no nativo	Sitio de glicosila-ción no nativo	SEQ ID NO.

212

		(numeración de FVII maduro)	(numeración de quimotripsina)	
S52A	S[52]A	ninguno	ninguno	206
S60A	S[60]A	ninguno	ninguno	207
E394N/P395A1R396S	E245N/P246A1R247S	N394	N245	208
R202S	R62S	N200	N60d	209
A292N/A294S	A150N/A152S	N292	N150	210
G318N	G170fN	N318	N170f	211
A175S	A39S	N173	N37	212
K109N	K[109JN	N109	N[109j	213
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	N122	N[122]	214
A51N	A[51]N	N51	N[51]	215
T130NIE132S	T[130jN/E[132]S	N130	N[130]	216
A122N/G124S/E394N/P395A/R396S	A[122JN/G[124]S/E245N/P246A/R247S	N122 y N394	N[122] y N245	217
A122N/G124S/E394N/P395A/R396S/G318N	A[122]N/G[124]S/E245N/P246A1R247S/G170fN	N122, N394 y N318	N[122], N245 y N318	218
S52A/S60A	S[52]A/S[601A	ninguno	ninguno	219
S52N/P54S	S[52]N/P[54]S	N52	N[52]	220
S119N/L121S	S[119]N/L[121]S	N119	N[119]	221
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	N128	N[128]	222
Q66N/Y68S	Q[66]N/Y[68]S	N66	N[66]	223
S52N7P54S/A122N/G124S/E394N/P395A/R396S	S[52]N/P[54]S/A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/R247S	N52, N122 y N397	N[52], N[122] y N245	224
KIO9N/A292N/A294S	K[109]N/A150N/A152S	N109 y N292	N[109] y N150	225
K109N/A175S	K[109]N/A39S	N109 y N173	N[109] y N37	226
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	N119 y N173	N[119] y N37	271
T128N/P129A1A175S	T[128]N/P[129]A/A39A	N128 y N173	N[1281 y N37	272
A122N/G124S/A17	A[122]N/G[124]	N122 y N173	N[122] y N37	273

213

5S	S/A39S			

5. Enlace incrementado a la albúmina de suero y/o a la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$

El FVII no modificado recombinante tiene una vida media de suero de únicamente 1.5-3 horas en humanos. El incremento de la vida media del suero de un polipéptido FVII puede reducir en cantidad y frecuencia a las dosificaciones requeridas para el efecto terapéutico. Se pueden emplear varias estrategias para incrementar la vida media del suero que incluyen, pero no se limitan a, incrementar la glicosilación, incrementar la resistencia a la proteasa, PEGilación y conjugación o fusión a proteínas más grandes, tal como albúmina de suero y la porción Fc de IgG. Estas modificaciones pueden dar por resultado, por ejemplo, degradación reducida del polipéptido FVII por las proteasas en suero, eliminación renal reducida, eliminación hepática reducida, y neutralización o eliminación reducida por el sistema inmunitario. Otra estrategia que se puede emplear para incrementar la vida media del suero de un polipéptido FVII implica el injerto de las secuencias de enlace dentro de un polipéptido FVII no modificado para establecer interacciones nuevas o mejoradas de proteína-proteína que no se observan en un polipéptido FVII no modificado.

Las secuencias de enlace que se insertan dentro del polipéptido FVII no modificado pueden contener aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 o más de residuos de aminoácidos que facilitan la interacción con otra proteína. Las secuencias de enlace pueden corresponder a una

214

secuencia de enlace presente naturalmente en una proteína nativa, o pueden ser una secuencia de enlace sintética con poco o nada de correlación de secuencia a las secuencias de enlace presentes naturalmente en una proteína nativa. Las secuencias de enlace usadas para modificar los polipéptidos FVII en este documento interactúan específicamente con un sito de enlace u otra proteína, estableciendo una interacción de proteína-proteína no covalente. En algunos ejemplos, la proteína por la cual la secuencia de enlace es específica es una proteína de suero, tal como, por ejemplo, albúmina de suero. Estas secuencias son bien conocidas en el campo (véase por ejemplo US20030069395, US20040009534 y US20070202045). En otros ejemplos, la proteína reconocida por la secuencia de enlace es un receptor de superficie celular o ligando tal como, por ejemplo, integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta 3$ (Smith *y colaboradores* (1995) J. Biol. Chem. 270:30486-30490). La afinidad con la cual el polipéptido FVII modificado se enlaza a la proteína de suero o al receptor de superficie celular se caracteriza típicamente por una constante de disociación, Kd, de 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM, 1 pM o menor. El enlace del polipéptido FVII modificado a la proteína de suero o al receptor de superficie celular por la vía de la secuencia de enlace puede reducir, por ejemplo, la eliminación renal o la eliminación hepática del polipéptido FVII modificado comparado con un polipéptido FVII no modificado. En algunos ejemplos, el enlace del polipéptido FVII modificado a un receptor de superficie celular también puede fijar como objetivo el polipéptido FVII modificado a una célula deseada o tipo de tejido o región en el cuerpo,

215

"concentrando" en consecuencia ese polipéptido FVII en un sito particular, tal como, por ejemplo, un coágulo sanguíneo. De esta manera, los polipéptidos FVII modificados que contienen las secuencias de enlace injertadas pueden exhibir vida media incrementada comparada con un polipéptido FVII no modificado.

a. Polipéptidos FVII ejemplares con secuencias de enlace de albúmina de suero

Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que contiene secuencias de enlace de albúmina de suero, los polipéptidos FVII modificados pueden enlazarse a la albúmina de suero *in vitro* o *in vivo,* dando por resultado una vida media incrementada. De esta manera, se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados con vida media incrementada comparado con un polipéptido FVII no modificado. Cuando se evalúan en un ensayo *in vitro* apropiado, o *in vivo,* tal como después de la administración a un sujeto como un agente terapéutico procoagulante, los polipéptidos FVII modificados pueden exhibir actividad coagulante incrementada como son comparados con los polipéptidos FVII no modificados.

Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento pueden contener secuencias de enlace de albúmina de suero. Las secuencias de enlace de albúmina de suero se pueden insertar dentro del polipéptido FVII no modificado o se pueden enlazar a la C- o N-terminal del polipéptido FVII. Por ejemplo, la secuencia de enlace de albúmina de suero se puede extender desde el residuo de prolina en la posición de aminoácidos 406 en la C-término del polipéptido FVII (que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3). Si las

216

secuencias de enlace se insertan en el polipéptido FVII, la inserción está en una posición tal que el polipéptido FVII modificado resultante retiene por lo menos una actividad de un polipéptido FVII no modificado. La secuencia de enlace se puede insertar en el polipéptido FVII sin remover ninguno de los residuos de aminoácidos en el polipéptido FVII, o pueden reemplazar uno o más residuos de aminoácidos en el polipéptido FVII. En algunos ejemplos, una secuencia de enlace de albúmina de suero reemplaza los residuos de aminoácidos S103 a S111 (que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3) para generar un polipéptido FVII modificado. En otros ejemplos, una secuencia de enlace de albúmina de suero reemplaza los residuos de aminoácidos H115 a S126, o T128 a P134 (que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3). Las secuencias de enlace de albúmina de suero ejemplares se exponen en SEQ ID NOS: 206-212.

La Tabla 10 proporciona ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares que se pueden hacer a un polipéptido FVII insertando una secuencia de enlace de albúmina de suero. Como se observa anteriormente, la inclusión de una secuencia de enlace de albúmina de suero puede incrementar la vida media de un polipéptido FVII. De esta manera, los polipéptidos FVII modificados pueden tener actividad coagulante incrementada. En referencia y con las modificaciones listadas en la Tabla 10, los residuos de aminoácidos en los cuales la secuencia de enlace de albúmina de suero se inserta en el polipéptido FVII, y la secuencia de enlace, ambas se representan en la tabla. Por ejemplo, el S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF indica que los

217

residuos de aminoácidos S103 a S111 de una numeración de longitud completa del polipéptido FVII no modificado residuos que corresponden a las secuencias del polipéptido FVII maduro expuesta en SEQ ID NO: 3) se han suprimido y reemplazado con una secuencia de enlace de albúmina de suero con la secuencia de aminoácidos QRLMEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID NO:206). La citación de precisamente un residuo de aminoácido individual, tal como P406, indica que la secuencia de enlace de albúmina de suero se inserta después de que el P406 y ninguno de los residuos de aminoácidos se han suprimido del polipéptido FVII. Las posiciones de aminoácidos para la mutación también son referidas por el esquema de numeración de quimotripsina donde sea apropiado. En casos donde una posición de aminoácidos modificada no tiene un número de quimotripsina correspondiente (es decir, no está dentro de las posiciones de aminoácidos 153 a 406 que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3, y no se expone en la Tabla 1, anterior), la posición se indica en corchetes usando la numeración de FVII maduro. Por ejemplo, S103 no tiene un número de quimotripsina correspondiente y se expone como S[103] cuando se refiere a la numeración de quimotripsina. En la Tabla 10 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el cual las secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido FVII modificado se exponen.

Tabla 10.

Modificación - numeración de FVII maduro	**Modificación - numeración de quimotripsina**	**SEQ ID NO**

218

S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	S[103]S[IIIjdelinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	227
H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	H[115]S[126]delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	228
T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	T[128]P[134]delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	229
S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE	S[103]S[111]delinsIEDICLPRWGCLW E	230
H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE	H[115]S[126]delinsIEDICLPRWGCLWE	231
T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE	T[128]P[134]delinsIEDICLPRWGCLW E	232
S103S111delinsDICLPRWGCLWED	S[103]S[111]delinsDICLPRWGCLWED	233
H115S126delinsDICLPRWGCLWED	H[115]S[126]delinsDICLPRWGCLWED	234
T128P134delinsDICLPRWGCLWED	T[128]P[134]delinsDICLPRWGCLWED	235
P406insIEDICLPRWGCLW	P257insIEDICLPRWGCLW	236
P406insGGGSIEDICLPRWGCLW	P257insGGGSIEDICLPRWGCLW	237
P406insDICLPRWGCLWED	P257insDICLPRWGCLWED	238
P406insGGGSDICLPRWGCLWED	P257msGGGSDICLPRWGCLWED	239

Los polipéptidos FVII modificados que contienen una secuencia de enlace de albúmina de suero pueden exhibir enlace incrementado a la albúmina de suero que es por lo menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparados con el polipéptido FVII no modificado de tipo silvestre a la albúmina de suero ya sea *in vivo* o *in vitro*. Los polipéptidos FVII modificados que se pueden enlazar a la albúmina de suero pueden exhibir vida media de suero implementada de por lo menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con la vida

219

media del suero del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo* o *in vitro*. La vida media de enlace de la albúmina de suero incrementada y/o de suero incrementada de los polipéptidos FVII modificados también se pueden manifestar como actividad de coagulación incrementada, durante de la actividad coagulante y/o índice terapéutico mejorado. La actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados se puede incrementar por lo menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo* o *in vitro*.

b. Polipéptidos FVII ejemplares con secuencias de enlace de integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$

Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que contienen secuencias de enlace de integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$. La integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ (también llamada glicoproteína (GP) IIb/IIIa) es el receptor de adhesión de plaquetas más abundante. Es un heterodímero dependiente de calcio que sirve como un receptor para las proteínas que incluyen, pero no se limitan a, fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, factor von Willebrand, y trombospondina. El enlace a los ligandos de la proteína "cognado" puede activar el $\alpha_{IIb}\beta_3$ e inducir a una transducción de señal en el citoplasma por la vía del dominio intracelular de la proteína. Los polipéptidos FVII modificados que contienen secuencias de enlace de integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$, por lo tanto, pueden enlazarse a las plaquetas. Los polipéptidos FVII modificados se

220

pueden enlazar a la integrina de plaquetas $O_{IIb}\beta_3$ (la forma actividad y/o desactivadas) *in vitro* o *in vivo*, dando por resultado una vida media incrementada. Aquellas variantes de FVIIa que se enlazan selectivamente a $\alpha_{IIb}\beta_3$ pueden, por lo tanto, ser fijadas como objetivo a plaquetas activadas y concentradas de esta manera en el sitio de un coágulo sanguíneo en desarrollo. El objetivo selectivo de FVIIa para coágulos sanguíneos en evolución sería esperado que mejoren la actividad terapéutica de la variante al mejorar tanto la eficacia como el índice terapéutico. De esta manera, se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados con vida media incrementada comparados con un polipéptido FVII no modificado y variantes que, además, se enlazan selectivamente a las plaquetas activadas. Cuando se evalúa en un ensayo *in vitro* apropiado, o *in vivo*, tal como después de la administración a un sujeto como un agente terapéutico pro-coagulante, los polipéptidos FVII modificados pueden exhibir actividad coagulante incrementada como es comparado con los polipéptidos FVII no modificados.

Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento contienen secuencias de enlace de integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$. Las secuencias de enlace de integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ se pueden insertar con el polipéptido FVII no modificado o se pueden enlazar a la C- o N-terminal del polipéptido FVII. Por ejemplo, las secuencias de enlace $\alpha_{IIb}\beta_3$ se pueden extender desde el residuo de prolina en la posición de aminoácidos 406 en la C-terminal del polipéptido FVII (que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID

221

NO:3). Si las secuencias de enlace se insertan dentro del polipéptido FVII, la inserción está en una posición tal que el polipéptido FVII modificado resultante retiene por lo menos una actividad de un polipéptido FVII no modificado. La secuencia de enlace se puede insertar dentro del polipéptido FVII sin remover ninguno de los residuos de aminoácidos en el polipéptido FVII, o puede reemplazar uno o más residuos de aminoácidos en el polipéptido FVII. En algunos ejemplos, una secuencia de enlace de integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ reemplaza los residuos de aminoácidos S103 a S111 (que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3) para generar un polipéptido FVII modificado. En otros ejemplos, una secuencia de enlace $\alpha_{IIb}\beta 3$ reemplaza los residuos de aminoácidos H115 a S126, o T1 28 a P134 (que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3). Las secuencias de enlace de integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ ejemplar se exponen en SEQ ID NOS: 213-215.

La Tabla 11 proporciona ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares que se pueden hacer a un polipéptido FVII para insertar una secuencia de enlace de integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta 3$. Como se observa anteriormente, la inclusión de una secuencia de enlace de integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta 3$ puede incrementar la vida media del suero de un polipéptido FVII y/o fijar como objetivo la proteína a un coágulo sanguíneo en evolución. De esta manera, los polipéptidos FVII modificados pueden tener actividad coagulante incrementada. En referencia con las modificaciones listadas en la Tabla 11, los residuos de

422

aminoácidos en los cuales la secuencia de enlace de integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta 3$ se inserta en el polipéptido FVII, y la secuencia de la secuencia de enlace, ambas se representan en la tabla. Por ejemplo, H115S126delinsSFGRGDIRNV indica que los residuos de aminoácidos H115 a S126 de una numeración de longitud completa del polipéptido FVII no modificado (residuos que corresponden a la secuencia de polipéptido FVII maduro expuesta en SEQ ID NO: 3) se han suprimido y reemplazado con una secuencia de enlace $\alpha_{IIb}\beta 3$ con la secuencia de aminoácidos SFGRGDIRNV (SEQ ID NO:213). La citación de tan solo un residuo de aminoácido individual, tal como P406, indica que la secuencia de enlace $\alpha_{IIb}\beta 3$ se inserta después de que P406 y ninguno de los residuos de aminoácido se han suprimido del polipéptido FVII. Las posiciones de aminoácidos para la mutación también son referidas por el esquema de numeración de quimotripsina donde es apropiado. En casos donde una posición de aminoácidos modificada no tiene un número de quimotripsina correspondiente (es decir no está dentro de las posiciones de aminoácido positions 153 a 406 que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3, y no se expone en la Tabla 1, anterior), la posición se indica en corchetes que usan una numeración de FVII maduro. Por ejemplo, S103 no tiene un número de quimotripsina correspondiente y se expone como S[103] cuando se refiere a la numeración de quimotripsina. En la Tabla 11 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el cual las secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido FVII modificado se exponen.

223

Tabla 11.

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
S103S111delinsSFGRGDflNV	S[103]S[111]deIInsSFGRGDIRNV	240
H115S126delinsSFGRGDIRNV	H[115]S[126]deIInsSFGRGDIR.NV	241
TI28P134delinsSFGRGDIRNV	T[128]P[134]deIInsSFGRGDIRNV	242
P4O6insCSFGRGDIRNVC	P257insCSFGRGDIRNVC	243
P4O6insGGGSCSFGRGDIRNVC	P257insGGGSCSFGRGDIRNVC	244

Los polipéptidos FVII modificados que contienen una secuencia de enlace de integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ puede exhibir enlace incrementado a la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ que es por lo menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparado con el enlace del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre a la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ *in vivo*. Los polipéptidos FVII modificados que se pueden enlazar a las plaquetas por la vía de integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ puede exhibir vida media incrementada de por lo menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con la vida media del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. La vida media incrementada de estos polipéptidos FVII modificados también se puede manifestar como actividad de coagulación incrementada, duración de la actividad coagulante y/o índice terapéutico mejorado. Por ejemplo, la actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados se puede incrementar por lo menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o comparada

221

con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo* o *in vitro*.

6. Modificación mediante la introducción de un dominio Gla heterólogo

La interacción de los residuos en el dominio Gla γ-carboxilado de proteínas de plasma dependientes de vitamina K, tal como FVII, FIX, FX, protrombina, proteína C y proteína S, y fosfolípidos negativamente cargados sobre la superficie de la membrana es importante para la hemostasis. Los dominio Gla de las proteínas de plasma dependientes de vitamina K contienen típicamente de manera aproximada 45 aminoácidos, de los cuales 9 a 12 residuos de ácido glutámico se modifican postraduccionalmente por la carboxilación dependiente de vitamina K para formar γ-carboxiglutamato (Gla). Los aminoácidos que forman el dominio Gla se posiciona inmediatamente después de aquellos que forman el péptido de señal y el propéptido de las proteínas, y se sitúan por lo tanto en la N-término después del procesamiento y la escisión de los polipéptidos precursores a las proteínas maduras. Por ejemplo, los aminoácidos que forman el dominio Gla en FVII están en las posiciones 39-83 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO:1, las posiciones 61-105 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 2, y las posiciones 1 a 45 del polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO:3. De éstos, los 10 residuos de ácido glutámico en las posiciones E6, E7, E14, E19, E20, E25, E26, E29 y E35 el Polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO: 3 se modifican mediante la carboxilación para

225

generar residuos de γ-carboxiglutamato (Gla).

Debido a su afinidad de enlace relativamente baja para las plaquetas activadas, el dominio Gla de FVII es un objetivo para la modificación, con la meta de mejorar la interacción entre el FVII modificado y la membrana de fosfolípido, incrementado en consecuencia la actividad de coagulación. La modificación se puede efectuar mediante la sustitución de aminoácidos específicos que se implican en este interacción (*véase, por ejemplo,* Shah *y colaboradores* PNAS 95: 4429-4234, Harvey *y colaboradores* (2003) J Biol Chem 278:8363-8369). Alternativamente, la modificación se puede efectuar mediante la sustitución del dominio Gla completo con el dominio Gla de otra proteína dependiente de vitamina K es decir el intercambio del dominio Gla. Este tipo de modificación da por resultado una proteína quimérica, tal como aquella la cual resultó cuando el dominio Gla de la proteína C se reemplazó con el dominio Gla de FVII (Geng *y colaboradores* (1997) Thromb Haemost 77:926-933).

Típicamente, tal modificación incluye la introducción, tal como mediante la adición o sustitución, de un dominio Gla heterólogo o una porción suficiente del mismo para efectuar el enlace de fosfolípidos dentro de una región del polipéptido FVII para generar un polipéptido FVII modificado quimérico. Generalmente, este polipéptido FVII quimérico retiene por lo menos una actividad de FVII. El enlace y/o afinidad de los polipéptidos FVII modificados con Gla para las plaquetas activadas se puede incrementar por lo menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparado

226

con el enlace y/o afinidad del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo* o *in vitro*. El enlace y/o afinidad para las plaquetas activadas por los polipéptidos FVII modificados también se puede manifestar como actividad de coagulación incrementada. La actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados con Gla se puede incrementar por lo menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo* o *in vitro*.

Un dominio Gla o porción suficiente del mismo para efectuar el enlace de fosfolípido, tal como 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más del dominio Gla heterólogo, contenido dentro de cualquier polipéptido se puede usar como una fuente de dominio Gla heterólogo para la introducción o reemplazo de una región de un polipéptido FVII. Típicamente, este dominio Gla heterólogo exhibe afinidad de enlace para los fosfolípidos, por ejemplo, fosfolípidos presentes sobre la superficie de una plaqueta activada. Generalmente, la selección de un dominio Gla heterólogo es uno que exhibe afinidad más alta para los fosfolípidos como es comparada con la afinidad del dominio Gla de FVII. El dominio Gla exacto, o porción suficiente del mismo, usado como un dominio heterólogo para la modificación de un polipéptido FVII se puede determinar racional o empíricamente. Ejemplares de los polipéptidos que contienen Gla incluyen, pero no se limitan a FIX, FX, protrombina, proteína C, proteína S,

227

osteocalcina, proteína Gla de matriz, proteína 6 específica de retraso de crecimiento (Gas6), y proteína Z. Los dominios Gla de esas proteínas ejemplares se exponen en cualquiera de SEQ ID NOS: 83-91. Por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o más aminoácidos contiguos, o el dominio Gla completo del domino Gla heterólogo se puede introducir dentro de un polipéptido FVII. Además, la introducción del dominio Gla dentro de un polipéptido FVII también puede incluir aminoácidos adicionales no parte del dominio Gla del polipéptido heterólogo siempre y cuando los aminoácidos adicionales no debiliten significativamente la capacidad de enlace del fosfolípido del dominio Gla introducido.

En algunos ejemplos, la introducción es mediante la adición del dominio Gla al polipéptido FVII tal que el dominio Gla heterólogo se inserta dentro del dominio Gla endógeno o dentro de otra región o dominio del polipéptido FVII siempre y cuando el polipéptido FVII modificado retenga por lo menos una actividad de FVII. En estos ejemplos, el dominio Gla nativo del polipéptido FVII se retiene el en el polipéptido, aunque en algunos casos la secuencia de aminoácidos que constituye el dominio Gla nativo se interrumpe. En otros ejemplos, el dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo, se inserta adyacente a, ya sea sobre la N- o C-término, del domino Gla nativo, tal que el domino Gla nativo no se interrumpe. En un ejemplo adicional, el dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo, se inserta dentro de otro dominio del polipéptido FVII.

También se proporcionan en este documento polipéptidos

228

FVII de dominio Gla modificados donde todo o una porción contigua del dominio Gla endógeno de FVII se remueve y se reemplaza con un dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo para efectuar el enlace de fosfolípido, siempre y cuando el polipéptido FVII modificado retenga por lo menos una actividad de FVII. Esta modificación también es referida como un intercambio de dominio Gla. Ejemplares de las modificaciones de intercambio Gla son aquellas en las cuales el dominio Gla endógeno se reemplaza con todo o una porción del dominio Gla de cualquiera de FIX (SEQ ID NO:83), FX (SEQ ID NO:84), trombina (SEQ ID NO:85), Proteína C (SEQ ID NO:86) o Proteína S (SEQ ID NO: 87). Estas modificaciones son llamadas "Gla Intercambio FIX," "Gla Intercambio FX," "Gla Intercambio Trombina", "Gla Intercambio Prot C" y "Gla Intercambio Prot S," respectivamente. Estos polipéptidos FVII modificados pueden exhibir enlace incrementado a las plaquetas activadas, dando por resultado una actividad coagulante incrementada. La modificación "Gla Intercambio FIX" implica la supresión del dominio FVII Gla endógeno a suprimir los residuos de aminoácidos A1 a Y44 (residuos que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3) y a la inserción de 45 residuos de aminoácidos que corresponden a los residuos de aminoácidos Y1 a Y45 del dominio FIX Gla expuesto en SEQ ID NO:83. La modificación Gla Intercambio FX implica la supresión de residuos de aminoácidos A1 a Y44 (residuos que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3) y la inserción de 44 residuos de aminoácidos que corresponden a A1 a Y44 del dominio FX Gla expuesto en SEQ ID NO: 84. La

229

modificación Gla Intercambio Trombina implica la supresión de residuos de aminoácidos A1 a Y44 (residuos que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3) y la inserción de 44 residuos de aminoácidos que corresponde a los residuos de aminoácidos Y1 a Y44 del dominio Trombina Gla expuesto en SEQ ID NO:85. La modificación Gla Intercambio Proteína C implica la supresión de los residuos de aminoácidos A1 a Y44 (residuos que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3) y la inserción de 44 residuos de aminoácidos que corresponden a los residuos de aminoácidos A1 a H44 del dominio Proteína C Gla expuesto en SEQ ID NO:86. La modificación Gla Intercambio Proteína S implica la supresión de los residuos de aminoácidos A1 a Y44 (residuos que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3) y la inserción de 44 residuos de aminoácidos que corresponden a los residuos de aminoácidos Y1 a Y44 del dominio Proteína S Gla expuesto en SEQ ID NO:87.

En algunos ejemplos, las modificaciones, que incluyen, pero no se limitan a, sustituciones o reemplazos, inserciones y/o supresiones de aminoácidos, se hacen al dominio Gla heterólogo que está siendo introducido en el polipéptido FVII. Estas modificaciones pueden efectuar, por ejemplo, el enlace incrementado a las plaquetas activadas, debido al enlace de fosfolípido incrementado, como es comparado con el enlace observado con la forma de tipo silvestre del dominio Gla heterólogo. Por ejemplo, si el dominio Factor IX Gla, o una porción de enlace de fosfolípido del mismo, se introduce en un polipéptido FVII para generar un polipéptido FVII modificado,

230

el dominio Factor IX Gla puede contener mutaciones de aminoácidos que confieren un enlace de fosfolípido incrementado comparado con el dominio Factor IX Gla de tipo silvestre. El dominio Gla heterólogo contenido en los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más modificaciones, tal como las sustituciones o reemplazos, inserciones y/o supresiones de aminoácidos.

En algunos ejemplos, la(s) modificación(es) en el domino Gla heterólogo incrementa(n) el enlace de fosfolípido. En otros ejemplos el dominio Gla heterólogo puede contener una o más mutaciones comparadas con la forma de tipo silvestre del dominio Gla heterólogo que confiere funciones similares a FVII al dominio Gla heterólogo. Por ejemplo, como se observa anteriormente, R36 del dominio FVII Gla expuesto en SEQ ID NO:119 se puede implicar en las interacciones con FX. Por consiguiente, el dominio Gla heterólogo puede contener modificaciones adicionales, tales como cualquiera requerida para mantener una arginina en la posición 36 del polipéptido FVII maduro, como se expone en SEQ ID NO:3, o cualquier otras modificaciones requeridas para mantener las propiedades de activación FX del polipéptido FVIIa modificado (Ruf *y colaboradores* (1999) Biochem 38:1957-1966). De esta manera, el algunos ejemplos, una mutación correspondiente a R36 se puede hacer en el dominio Gla heterólogo. La posición correspondiente se puede determinar por una persona experta en el campo, tal como mediante la alineación de secuencias de aminoácidos.

Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII

231

modificados que contienen una modificación Gla Intercambio en donde el dominio Gla heterólogo o la porción de enlace de fosfolípido del mismo, contiene una o más mutaciones comparadas con el dominio Gla heterólogo de tipo silvestre, y se introduce en el polipéptido FVII mediante el reemplazo de algo o todo el dominio FVII Gla endógeno. En un ejemplo, los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento contienen una modificación "Gla Intercambio FIX", la cual, como se describe anteriormente, implica la supresión de el dominio FVII Gla endógeno al suprimir los residuos de aminoácidos A1 a Y44 (residuos que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3) y la inserción de 45 residuos de aminoácidos que corresponden a los residuos de aminoácidos Y1 a Y45 del dominio FIX Gla expuesto en SEQ ID NO:83. El dominio FIX Gla usado en la modificación Gla Intercambio puede contener una o más mutaciones comparadas con la forma de tipo silvestre del dominio FIX Gla expuesto en SEQ ID NO:83, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o más mutaciones, tal como sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos. Por ejemplo, el dominio FIX Gla heterólogo en el polipéptido FVII modificado "Gla Intercambio FIX" puede contener una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos que corresponde a M19, E40, K43 y/o Q44 del dominio FIX Gla expuesto en SEQ ID NO:83.

En un ejemplo, el dominio FIX Gla contiene una sustitución de aminoácidos M19K. Esta modificación se indica por (Gla Intercambio FIX/MI 9K) es decir la metionina en la posición de aminoácidos que corresponde a la posición de aminoácidos 19 del dominio FIX Gla expuesto en SEQ ID NO:83 se reemplaza con una

232

lisina. En un ejemplo adicional, el dominio FIX Gla heterólogo modificado en el polipéptido FVII modificado contiene una sustitución de aminoácidos E40L indicada por y {FIX Gla Intercambio/E40L}, mediante lo cual el ácido glutámico en la posición de aminoácidos que corresponde la posición de aminoácidos 40 del dominio FIX Gla expuesto en SEQ ID NO: 83 se reemplaza con una leucina. También se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que contiene una sustitución K431 (indicada por {Gla Intercambio FIX/K43I}) en donde la lisina en la posición de aminoácidos que corresponde a la posición de aminoácidos 43 del dominio FIX Gla expuesta en SEQ ID NO: 83 se reemplaza con una isoleucina. En otro ejemplo, el dominio FIX Gla heterólogo modificado en el polipéptido FVII modificado contiene una sustitución de aminoácidos Q44S, indicada por {FIX Gla Intercambio/Q44S}, mediante lo cual la glutamina en la posición de aminoácidos que corresponde a la posición de aminoácidos 44 del dominio FIX Gla expuesta en SEQ ID NO: 83 se reemplaza con una serina. En un ejemplo, el dominio FIX Gla heterólogo contiene las sustituciones de aminoácidos M19K/E40L/K43I/Q44S.

Los polipéptidos FVII modificados que contienen un dominio Gla heterólogo, tal como dominio Gla heterólogo modificado, pueden exhibir actividad coagulante incrementada en dosificaciones más bajas como es comparado con una molécula FVII de tipo silvestre, tal como NovoSeven^{MR} debido al enlace y/o afinidad incrementada para las plaquetas activadas. La actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados con Gls se pueden incrementar por lo menos o aproximadamente

233

1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparada con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o de tipo silvestre ya sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

7. Combinaciones y Modificaciones Adicionales

Cualquiera o más de las modificaciones descritas anteriormente se pueden combinar con cualquier otra(s) modificación(es) descrita(s) anteriormente o descrita(s) en cualquier lugar en el campo. De esta manera, además de la modificación de los polipéptidos FVII para tener resistencia incrementada a AT-III, la actividad catalítica incrementada, resistencia incrementada a la inhibición por Zn^{2+} glicosilación alterada, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tal como vida media incrementada, enlace y/o afinidad incrementada a la albúmina de suero, enlace y/o afinidad incrementada a fosfolípidos, o enlace y/o afinidad incrementada para la integrina de plaquetas $\alpha IIB\beta_3$, los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento también incluyen aquellos que exhiben más de una de las propiedades mencionadas anteriormente. Típicamente, estas modificaciones adicionales son aquellas que por sí mismas dan por resultado una actividad coagulante incrementada del polipéptido modificado y/o estabilidad incrementada del polipéptido. Por consiguiente, los polipéptidos FVII modificados resultantes exhiben una actividad coagulante incrementada. Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, cualquier sustitución, supresión o inserción de aminoácidos conocidos en el campo, típicamente

cualquiera que incremente la actividad y/o estabilidad coagulante del polipéptido FVII. Cualquiera polipéptido FVII modificado proporcionado en este documento puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más de modificaciones de aminoácidos adicionales, siempre y cuando el polipéptido FVII modificado resultante retenga una actividad FVII del polipéptido no modificado de tipo silvestre.

En un ejemplo, la modificación adicional se puede hacer a la secuencia de polipéptido FVII tal que su interacción con otros factores, moléculas y proteínas se altere. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos que se implican en la interacción con el inhibidor de vía de factor de tejido (TFPI) se puede reemplazar tal que la afinidad y/o enlace del polipéptido FVII modificado a TF se disminuye. Otras modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificación de aminoácidos que se implican en interacciones con el factor X, factor IX, factor de tejido (TF) y fosfolípidos. En algunos ejemplos, la modificación hecha a la secuencia de polipéptido FVII incluye la inserción de aminoácidos que constituye una secuencia de enlace, tal como, por ejemplo, una secuencia de enlace de albúmina de suero o una secuencia de enlace IIb-IIIa de glicoproteína.

También se pueden hacer modificaciones adicionales a un polipéptido FVII modificado proporcionado en este documento que altere la conformación o plegamiento del polipéptido. Estos incluyen, por ejemplo, el reemplazo de uno o más aminoácidos con una cisteína tal que se forma un nuevo enlace de disulfuro, o modificaciones que estabilizan una conformación de α-hélice,

235

impartiendo en consecuencia actividad incrementada al polipéptido FVII modificado.

También se pueden hacer modificaciones adicionales al polipéptido FVII para efectuar las modificaciones post-traduccionales. Por ejemplo, el polipéptido se puede modificar para incluir sitios de glicosilación adicionales tal que el polipéptido FVII modificado resultante tiene glicosilación incrementada comparado con un polipéptido FVII no modificado. Las modificaciones también se pueden hacer para introducir residuos de aminoácidos que se pueden enlazar subsecuentemente a una porción química, tal como uno que actúa para incrementar la estabilidad del polipéptido FVII modificado. La estabilidad de un polipéptido FVII también se puede alterar al modificar los sitios proteolíticos potenciales, incrementando en consecuencia la resistencia del polipéptido FVII modificado a las proteasas.

Adicionalmente, las sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos se pueden hacer en el dominio Gla endógeno tal que el polipéptido FVII modificado exhibe enlace y/o afinidad incrementada para las membranas de fosfolípidos. Estas modificaciones pueden incluir una sola sustitución de aminoácidos, supresiones y/o inserciones, o pueden incluir una sustitución, supresión o inserción de aminoácidos de múltiples aminoácidos. Por ejemplo, todo o parte del dominio Gla endógeno se puede reemplazar con todo o parte de un dominio Gla heterólogo. En otros ejemplos, los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento pueden exhibir supresiones en el dominio Gla endógeno o sustituciones en las

236

posiciones que están normalmente gamma-carboxilados (US20070037746).

Las siguientes secciones describen ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en el campo para efectuar una estabilidad incrementada y/o actividad coagulante de un polipéptido FVII. Como se plantea anteriormente, estas modificaciones también se pueden incluir adicionalmente en cualquier polipéptido FVII modificado proporcionado en este documento. Las posiciones de aminoácidos referenciadas posteriormente corresponden al polipéptido FVII maduro como se expone en SEQ ID NO:3. Las mutaciones correspondientes se pueden hacer en otros polipéptidos FVII tal como variantes alélicas, especies o de empalme del polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3.

a. Modificaciones que incrementan la resistencia a TFPI

En un ejemplo, se pueden hacer modificaciones adicionales a un polipéptido FVII modificado que contiene una modificación en la posición de aminoácidos 286 por la numeración de FVII maduro que da por resultado resistencia incrementadas a TFPI. Esta resistencia a TFPI se puede lograr, por ejemplo, mediante la mutación de uno o más residuos en FVII implicado en la interacción y enlace con TFPI para reducir o prevenir este enlace, haciendo en consecuencia los polipéptidos FVII modificados resistentes a los efectos naturalmente inhibidores de TFPI con respecto a la iniciación de coagulación. Por ejemplo, las modificaciones se pueden hacer en los residuos de aminoácidos que son residuos de contacto FVII/TFPI o residuos en proximidad cercana con la superficie de interacción.

237

Ejemplos de modificaciones adicionales que se pueden incluir en los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento para incrementar la resistencia a TFPI incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en la publicación de patente internacional No. WO2004/083361, Neuenschwander *y colaboradores*, (1995) Biochemistry 34:8701-8707, Chang *y colaboradores*, (1999) Biochemistry 38:10940-10948, y Iakhiaev etal., (2001) Thromb. Haemost. 85:458-463, y la solicitud relacionada de E.U.A. No. serie 12/082,662. Ejemplos no limitantes de modificaciones de aminoácidos ejemplares descritos en el campo que pueden dar por resultado resistencia incrementada a TFPI del polipéptido FVII modificado incluyen cualquiera o más de Q176, D196K, D196R, D196A, D196Y, D196F, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, R290M, R290V, K341E, K341R, K341Q, K341N, K341M, K341D, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA y K197I198insS (donde, por ejemplo, G237T238insAS indica una modificación en la cual una alanina (A) y una serina (S) se han insertado entre la glicina en la posición 237 (G237) y la treonina en la posición 238).

b. Modificaciones que incrementan la actividad intrínseca

En un ejemplo, se pueden hacer modificaciones adicionales a un polipéptido de factor VII modificado proporcionado en este

238

documento que da por resultado una actividad catalítica incrementada hacia el factor X. Por ejemplo, se pueden hacer modificaciones a los aminoácidos que se implican en la interacción con su co-factor, TF, tal que el polipéptido FVII modificado resultante tiene afinidad incrementada para TF, y exhibe en consecuencia actividad incrementada hacia FX. También se pueden hacer modificaciones a la bolsa de activación del polipéptido FVII, tal que la actividad intrínseca del polipéptido FVII modificado hacia FX se incrementa comparado con la actividad del polipéptido FVII no modificado. Otra estrategia de modificación que da por resultado la actividad incrementada implica la modificación del polipéptido FVII tal que el plegamiento y la conformación de la proteína se alteran a una forma más activa. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos tal que la región de bucle de α-hélice (que corresponde a las posiciones 305 a 321 de la secuencia madura como se expone en SEQ ID NO:3) del dominio de proteasa se estabiliza y se pliega más estrechamente al cuerpo del dominio de proteasa para conferir una forma más similar a zimógeno sobre el polipéptido FVII modificado. Un polipéptido más activo también se puede lograr mediante la modificación de los aminoácidos implicados en las β-hebras del polipéptido FVII. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos que introduzcan nuevos pares de cisteína que puedan formar nuevos enlaces de disulfuro los cuales pueden funcional para "bloquear" el polipéptido FVII modificado en una forma más activa.

Ejemplos de modificaciones adicionales que se pueden

incluir en los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento para incrementar la actividad intrínseca del polipéptido FVII modificado incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos por Persson *y colaboradores* (2004) Biochem J. 379:497-503, Maun *y colaboradores* (2005) Prot Sci 14:1171-1180, Persson *y colaboradores* (2001) PNAS 98:13583-13588, Persson *y colaboradores* (2002) Eur J Biochem 269:5950- 5955, Soejima *y colaboradores* (2001) J Biol Chem 276:17229-17235, Soejima *y colaboradores* (2002) J Biol Chem 277:49027-49035, WO200183725, WO2002022776, WO2002038162, WO2003027147, WO200338162, WO2004029090, WO2004029091, WO2004108763 y WO2004111242. Ejemplos no limitantes de modificaciones de aminoácidos ejemplares descritas en el campo que pueden dar por resultado una actividad intrínseca incrementada del polipéptido FVII modificado incluyen cualquiera o más de S279C/V302C, L280C/N301C, V281C/V302C, S282C/V299C, S314E, L39E, L39Q, L39H, I42R, S43Q, S53N, K62E, K62R, K62D, K62N, K62Q, K62T, L65Q, L65S, F71D, F71Y, F71E, F71Q, F71N, P74S, P74A, A75E, A75D, E77A, E82Q, E82N, T83K, E116D, K157V, K157L, K157I, K157M, K157F, K157W, K157P, K157G, K157S, K157T, K157C, K157Y, K157N, K157E, K157R, K157H, K157D, K157Q, V158L, V158I, V158M, V158F, V158W, V158P, V158G, V158S, V158T, V158C, V158Y, V158N, V158E, V158R, V158K, V158H, V158D, V158Q, A274M, A274L, A274K, A274R, A274D, A274V, A274I, A274F, A274W, A274P, A274G, A274T, A274C, A274Y, A274N, A274E, A274H, A274S, A274Q, F275H, E296V, E296L, E296I, E296M, E296F, E296W, E296P, E296G, E296S, E296T, E296C, E296Y, E296N, E296K, E296R, E296H, E296D, E296Q, M298Q, M298V, M298L, M298I, M298F, M298W, M298P, M298G, M298S, M298T, M298C,

210

M298Y, M298N, M298K, M298R, M298H, M298E, M298D, R304Y, R304F, R304L, R304M, L305 V, L305Y, L305I, L305F, L305A, L305M, L305W, L3O5P, L305G, L305S, L305T, L305C, L305N, L305E, L305K, L305R, L305H, L305D, L305Q, M306D, M306N, D309S, D309T, S314A, S314V, S314I, S314M, S314F, S314W, S314P, S314G, S314L, S314T, S314C, S314Y, S314N, S314E, S314K, S314R, S314H, S314D, S314Q, D334G, D334E, D334A, D334V, D334I, D334M, D334F, D334W, D334P, D334L, D334T, D334C, D334Y, D334N, D334K, D334R, D334H, D334S, D334Q, S336G, S336E, S336A, S336V, S336I, S336M, S336F, S336W, S336P, S336L, S336T, S336C, S336Y, S336N, S336K, S336R, S336H, S336D, S336Q, K337L, K337V, K337I, K337M, K337F, K337W, K337P, K337G, K337S, K337T, K337C, K337Y, K337N, K337E, K337R, K337H, K337D, K337Q, F374P, F374A, F374V, F374I, F374L, F374M, F374W, F374G, F374S, F374T, F374C, F374Y, F374N, F374E, F374K, F374R, F374H, F374D, F374Q, y sustitución de las posiciones 300-322, 305-322, 300-312, o 305-312 con los aminoácidos correspondientes de tripsina, trombina o FX, y sustitución de las posiciones 310-329, 311-322 o 233-329 con los aminoácidos correspondientes de tripsina.

c. Modificaciones que incrementan la resistencia a las proteasas

Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento también pueden contener modificaciones adicionales que dan por resultado una resistencia incrementada del polipéptido a las proteasas. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos que remuevan uno o más sitios de escisión proteolíticos potenciales. Los polipéptidos FVII

241

modificados de esta manera se pueden hacer más resistentes a las proteasas, incrementando en consecuencia la estabilidad y vida media del polipéptido modificado.

Ejemplos de modificaciones adicionales que se pueden incluir en los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento para incrementar la resistencia a las proteasas incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en la patente de E.U.A No. US5580560 o Solicitud Publicada Internacional Nos. WO1988010295 y WO2002038162. Ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en el campo que pueden dar por resultado una resistencia incrementada del polipéptido FVII modificado a inhibidores y/o proteasas incluyen cualquiera o más de K32Q, K32E, K32G, K32H, K32T, K32A, K32S, K38T, K38D, K38L, K38G, K38A, K38S, K38N, K38H, I42N, I42S, I42A, I42Q, Y44N, Y44S, Y44A, Y44Q, F278S, F278A, F278N, F278Q, F278G, R290G, R290A, R290S, R290T, R290K, R304G, R304T, R304A, R304S, R304N, R315G, R315A, R315S, R315T, R315Q, Y332S, Y332A, Y332N, Y332Q, Y332G, K341E, K341Q, K341G, K341T, K341A y K341S.

d. Modificaciones que incrementan la actividad para los fosfolípidos

El polipéptido FVII modificado proporcionado en este documento también puede contener una o más modificaciones adicionales para incrementar la afinidad para los fosfolípidos. La actividad coagulante de FVII se puede mejorar al incrementar el enlace y/o afinidad del polipéptido para los fosfolípidos, tales como aquellos expresados sobre la superficie de las plaquetas activadas. Esto se puede lograr, por ejemplo, al

242

modificar al dominio FVII Gla endógeno. La modificación se puede afectar mediante la sustitución de aminoácidos en una o más posiciones en el dominio Gla de un polipéptido FVII que da por resultado un polipéptido FVII modificado con capacidad incrementada de enlazarse a la fosfatidilserina y otros fosfolípidos negativamente cargados. Ejemplos de modificaciones adicionales para incrementar el enlace y/o afinidad de fosfolípidos y que se puede hacer para un polipéptido FVII modificado proporcionado en este documento que contiene un dominio FVII Gla endógeno, incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos por Harvey *y colaboradores* (2003) J Biol Chem 278:8363-8369, US20030100506, US20040220106, US20060240526, US6017882, US6693075, US6762286, WO200393465 y WO2004111242. Ejemplares de estas modificaciones incluyen cualquiera o más de una inserción de una tirosina en la posición 4, o modificación de cualquiera de P10Q, P10E, P10D, P10N, R28F, R28E, K32E, K32D, D33F, D33E, D33K A34E, A34D, A34I, A34L, A34M, A34V, A34F, A34W, A34Y, R36D, R36E, K38E y K38D.

e. Modificaciones que alteran la glicosilación

La alteración del grado, nivel y/o tipo de glicosilación de una proteína se ha descrito en el campo como un medio para reducir la inmunogenicidad, incrementar la estabilidad, reducir la frecuencia de administración y/o reducir los efectos secundarios adversos tal como inflamación. Normalmente, esto se efectúa al incrementar los niveles de glicosilación. El(los) sitio(s) de glicosilación proporciona(n) un sitio para la unión de una porción de carbohidrato sobre el polipéptido, tal que

213

cuando el polipéptido se produce en una célula eucariótica capaz de la glicosilación, se glicosila.

Existen cuatro sitios de glicosilación nativos en FVII; dos sitios de N- glicosilación en N145 y N322, y dos sitios de O- glicosilación en S52 y S60, que corresponde a las posiciones de aminoácidos en el polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3. En una modalidad, se pueden hacer modificaciones adicionales a un polipéptido FVII modificado proporcionado en este documento tal que la glicosilación en los sitios anteriores se interrumpe. Esto puede dar por resultado un polipéptido FVII modificado con actividad coagulante incrementada (*véase, por ejemplo,* WO2005123916). Ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en el campo que pueden dar por resultado una glicosilación disminuida y actividad incrementada del polipéptido FVII modificado como es comparado con un polipéptido FVII no modificado incluyen, pero no se limitan a S52A, S60A, N145Y, N145G, N145F, N145M, N145S, N145I, N145L, N145T, N145V, N145P, N145K, N145H, N145Q, N145E, N145R, N145W, N145D, N145C, N322Y, N322G, N322F, N322M, N322S, N322I, N322L, N322T, N322V, N322P, N322K, N322H, N322Q, N322E, N322R, N322W y N322C.

En otra modalidad, se pueden hacer modificaciones adicionales a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento tal que los sitos de glicosilación adicionales es introducen, incrementando de esta manera el nivel de glicosilación del polipéptido FVII modificado como es comparado con un polipéptido FVII no modificado. El sitio de glicosilación puede ser un sitio de

glicosilación N-enlazado u O-enlazado. Ejemplos de modificaciones que se pueden hacer a un polipéptido FVII que introducen uno o más nuevos sitios de glicosilación incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se describen en los documentos US6806063 y WO200393465. Ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en el campo que pueden dar por resultado una glicosilación incrementada del polipéptido FVII modificado como es comparado con un polipéptido FVII no modificado incluyen, pero no se limitan a F4S, F4T, P10N, Q21N, W41N, S43N, A51N, G58N, L65N, G59S, G59T, E82S, E82T, N95S, N95T, G97S, G97T, Y101N, D104N, T106N, K109N, G117N, G124N, S126N, T128N, A175S, A175T, G179N, I186S, I186T, V188N, R202S, R202T, I205S, I205T, D212N, E220N, I230N, P231N, P236N, G237N, V253N, E265N, T267N, E270N, R277N, L280N, G291N, P303S, P303ST, L305N, Q312N, G318N, G331N, D334N, K337N, G342N, H348N, R353N, Y357N, I361N, V376N, R379N, M391N, K32N/A34S, K32N/A34T, F31N/D33S, F31N/D33T, I30N/K32S, I30N/K32T, A34N/R36S, A34N/R36T, K38N/F40S, K38N/F40T, T37N/L39S, T37N/L39T, R36N/K38S, R36N/K38T, L39N/W41S, L39N/W41T, F40N/I42S, F40N/I42T, I42N/Y44S, I42N/Y44T, Y44N/D46S, Y44N/D46T, D46N/D48S, D46N/D48T, G47N/Q49S, G47N/Q49T, S52N/P54S, Q66N/Y68S, S119N/L121S, A122N/G124S, T128N/P129A, T130N/E132S, K143N/N145S, K143N/N145T, E142N/R144S, E142N/R144T, L141N/K143S, L141N/K143T, I140N/E142S/, I140N/E142T, R144N/A146S, R144N/A146T, A146N/K148S, A146N/K148T, S147N/P149S/, S147N/P149T, R290N/A292S, R290N/A292T, A292N/A294S, D289N/G291S, D289N/G291T, L288N/R290S, L288N/R290T, L287N/D289S, L287N/D289T, A292N/A294S,

215

A292N/A294T, T293N/L295S, T293N/L295T, R315N/V317S. R315N/V317T, S314N/K316S, S314N/K316T. Q313N/R315S, Q313N/R315T, K316N/G318S, K316N/G318T, V317N/D319S, V317N/D319T, K341N/D343S, K341N/D343T, S339N/K341S, S339N/K341T, D343N/G345S, D343N/G345T, R392N/E394S, R392N/E394T, L390N/R392S, L390N/R392T, K389N/M391S, K389N/M391T, S393N/P395S, S393N/P395T, E394N/R396S, E394N/R396T, E394N/P395A/R396S, P395N/P397S, P395N/P397T, R396N/G398S, R396N/G398T, P397N/V399S, P397N/V399T, G398N/L400S, G398N/L400T, V399N/L401S, V399N/L401T, L400N/R402S, L400N/R402T, L401N/A403S, L401N/A403T, R402N/P404S, R402N/P404T, A403N/F405S, A403N/F405T, P404N/P406S y P404N/P406T.

f. Modificaciones para facilitar el enlace del grupo químico

Modificaciones adicionales de un polipéptido FVII modificado proporcionado en este documento también se pueden hacer para facilitar el enlace subsecuente de un grupo químico. Se puede hacer una o más sustituciones o inserciones de aminoácidos tal que un grupo químico se puede enlazar a un polipéptido FVII modificado por la vía de aminoácido sustituido. Por ejemplo, una cisteína se puede introducir a un polipéptido FVII modificado, al cual una porción de polietilenglicol (PEG) se puede enlazar para conferir estabilidad incrementada y vida media del suero. Otros residuos de unión incluyen residuos de lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. En algunas modalidades, los residuos de aminoácidos se reemplazan para reducir el número de posiciones de enlace

000216

potenciales. Por ejemplo, el número de lisinas se puede reducir. Ejemplos de modificaciones que se pueden hacer a la secuencia de aminoácidos de un Polipéptido FVII el cual puede facilitar el enlace subsecuente con un grupo químico incluyen pero no se limitan a, aquellos que se describen en los documentos US20030096338, US20060019336, US6806063, WO200158935 y WO2002077218. Ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares de unos polipéptido FVII que pueden facilitar el enlace subsecuente con un grupo químico incluyen, pero no se limitan a; Q250C, R396C, P406C, I42K, Y44K, L288K, D289K, R290K, G291K, A292K, T293K, Q313K, S314K, R315K, V317K, L390K, M391K, R392K, S393K, E394K, P395K, R396K, P397K, G398K, V399K, L400K, L401K, R402K, A403K, P404K, F405K, I30C, K32C, D33C, A34C, T37C, K38C, W41C, Y44C, S45C, D46C, L141C, E142C, K143C, R144C, L288C, D289C, R290C, G291C, A292C, S314C, R315C, K316C, V317C, L390C, M391C, R392C, S393C, E394C, P395C, R396C, P397C, G398C, V399C, L401C, R402C, A403C, P404C, I30D, K32D, A34D, T37D, K38D, W41D, Y44D, S45D, D46C, L141D, E142D, K143D, R144D, L288D, R290D, G291D, A292D, Q313D, S314D, R315D, K316D, V317D, L390D, M391D, R392D, S393D, P395D, R396D, P397D, G398D, V399D, L401D, R402D, A403D, P404D, 130E, K32E, A34E, T37E, K38E, W41E, Y44E, S45E, D46C, L141E, E142E, K143E, R144E, L288E, R290E, G291E, A292E, Q313E, S314E, R315E, K316E, V317E, L390E, M391E, R392E, S393E, P395E, R396E, P397E, G398E, V399E, L401E, R402E, A403E, P404E, Kl 8R, K32R, K38R, K62R, K85R, K109R, K137R, K143R, K148R, K157R, K161R, K197R, K199R, K316R, K337R, K341R, K389R, K18Q, K32Q, K38Q, K62Q, K85Q, K109Q, K137Q, K143Q, K148Q, K157Q, K161Q, K197Q, K199Q, K316Q, K337Q, K341Q, K389Q,

K18N, K32N, K38N, K62N, K85N, K109N, K137N, K143N, K148N, K157N, K161N, K197N, K199N, K316N, K337N, K341N, K389N, K18H, K32H, K38H, K62H, K85H, K109H, K137H, K143H, K148H, K157H, K161H, K197H, K199H, K316H, K337H, K341H y K389H.

g. Mutaciones de combinación ejemplares

Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que tienen dos o más modificaciones diseñadas para efectuar una o propiedades o actividades de un polipéptido FVII no modificado. En algunos ejemplos, las dos o más modificaciones alteran dos o más propiedades o actividades del polipéptido FVII. Las modificaciones se pueden hacer a los polipéptido FVII tal que se altera una o más de la actividad catalítica, resistencia a, AT-III, resistencia a TFPI, resistencia a la inhibición Zn^{2+}, actividad intrínseca, actividad amidolítica, enlace y/o afinidad de fosfolípidos, glicosilación, resistencia a proteasas, vida media e interacción con otros factor eso moléculas, tal como FX, FIX, albúmina de suero e integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$. Típicamente, dos o más modificaciones se combinan tal que el polipéptido FVII modificado resultante tiene actividad coagulante incrementada, duración incrementada de la actividad de coagulante, y/o un índice terapéutico mejorado comparado con un polipéptido FVII no modificado. Las modificaciones pueden incluir una sustitución, inserción o supresión de aminoácidos. La actividad coagulante incrementada, duración incrementada de la actividad coagulante, y/o un índice terapéutico mejorado del polipéptido FVII modificado que contiene dos o más modificaciones se puede incrementar por lo menos

248

aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparado con la actividad del polipéptido FVIIa de partida o no modificado.

Se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que contienen dos o más modificaciones que se introducen dentro de un polipéptido FVII no modificado para alterar dos o más actividades o propiedades. Los polipéptidos FVII modificados pueden contener 2, 3, 4, 5, 6 o más modificaciones. Además, cada modificación puede implicar uno o más residuos de aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede contener dos modificaciones cada una de las cuales es una sola sustitución de aminoácidos. En otro ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede contener dos modificaciones, una de la cual es una sola sustitución de aminoácidos y la otra de la cual implica la supresión de más de un residuo de aminoácido y luego la inserción de más de un residuo de aminoácido. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado proporcionado en este documento puede contener la sustitución de aminoácidos S222A (residuos que corresponde al polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3) para interrumpir el enlace de Zn^{2+} y una modificación Gla Intercambio FDC, la cual implica la supresión del dominio FVII Gla endógeno al suprimir los residuos de aminoácidos A1 a Y44 (residuos que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3) y la inserción de 45 residuos de aminoácidos que corresponde a los residuos de aminoácidos Y1 a Y45 del dominio

FDC Gla expuesto en SEQ ID NO:83.

Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento pueden tener dos o más modificaciones seleccionadas únicamente de aquellas expuestas en la Tabla 5 a la Tabla 13. En otros ejemplos, el polipéptido FVII modificado contiene dos o más modificaciones donde una o más modificaciones se seleccionan de aquellas expuestas en la Tabla 5 a la Tabla 13 y una o más modificaciones son modificaciones adicionales que no se exponen en la Tabla 5 a la Tabla 13, tal como, por ejemplo, modificaciones descritas en el campo. En algunos ejemplos, la una o más modificaciones adicionales se pueden seleccionar de aquellas expuestas en la Sección D.6.a-e, anterior. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede contener una modificación en uno o más de los residuos de aminoácidos D196, K197, K199, G237, T239, R290 o K341 basado en la numeración de un FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3 (que corresponde a D60, K60a, K60c, G97, T99, R147 y K192, respectivamente, con base en la numeración de quimotripsina), lo cual puede incrementar la resistencia TFPI, y una modificación en uno o más residuos de aminoácidos que afecta la actividad intrínseca, tal como, por ejemplo, V158 y M298, (V21 y M156, respectivamente, con base en la numeración de quimotripsina). Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede contener dos sustituciones de aminoácido que incrementan la resistencia a TFPI, tal como K197E y G237V, y una sustitución de aminoácido que incrementa la actividad intrínseca, tal como M298Q, dando por resultado un polipéptido FVII con actividad coagulante incrementada.

Ejemplares de las modificaciones de combinación ejemplares

250

proporcionadas en este documento son aquellas que incluyen por lo menos la mutación Q286R (numeración que corresponde al polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3; que corresponde a Q143R por la numeración de quimotripsina). Los polipéptidos FVII modificados que contienen la modificación Q286R pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más modificaciones adicionales. Estas modificaciones adicionales se pueden incluir para, por ejemplo, alterar la actividad catalítica, resistencia a AT-III, resistencia a TFPI, resistencia a la inhibición por Zn^{2+}, actividad intrínseca, actividad amidolítica, enlace y/o afinidad de fosfolípidos, glicosilación, resistencia a las proteasas, vida media e interacción con otros factores o moléculas, tal como FX, FIX, albúmina de suero e integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$. Típicamente, los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento que contienen dos o más modificaciones, en donde una modificación es la sustitución de aminoácidos Q286R, exhiben actividad coagulante incrementada, comparado con el polipéptido FVII de tipo silvestre.

En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados que contienen dos o más modificaciones, en donde una es Q286R, exhiben actividad catalítica y coagulante incrementada comparado con el polipéptido de tipo silvestre así como también comparado con un polipéptido FVII que contiene cualquiera de las mutaciones solas. Por ejemplo, se proporcionan en este documento polipéptidos FVII modificados que contienen tanto las sustituciones de aminoácidos Q286R y M289Q (Q286R/M298Q con la numeración que corresponde al polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3; que corresponde a Q143R/M156Q por la numeración

251

de quimotripsina). El mutante FVII de combinación Q286R/M298Q exhibe actividad catalítica incrementada para su sustrato, Factor X, comparado con el FVII de tipo silvestre, el mutante individual Q286R y el mutante individual M298Q (véase por ejemplo el Ejemplo 4, posteriormente). Por ejemplo, en un estudio, el mutante M298Q exhibió una actividad catalítica para FX, en presencia de TF, que fue de aproximadamente 1.8 a 2 veces mayor que aquella de polipéptido de tipo silvestre, la actividad catalítica del mutante Q286R fue de aproximadamente 2.1 veces mayor que aquella del polipéptido FVII de tipo silvestre, y el mutante Q286R/M298Q exhibió una actividad catalítica para FX que fue aproximadamente 3.6-4.4 veces que de la actividad catalítica del polipéptido de tipo silvestre para FX (*véase* Tabla 15, posteriormente).

Se proporcionan modificaciones de combinación ejemplares no limitantes en la Tabla 12. Estas modificaciones de combinación ejemplares incluyen dos o más modificaciones que se diseñan para alterar dos o más actividades o propiedades de un polipéptido FVII, que incluyen, pero no se limitan a, resistencia a TFPI, resistencia a AT-III, actividad intrínseca, actividad amidolítica, actividad catalítica, enlace de Zn^{2+}, enlace y/o afinidad de fosfolípidos, glicosilación, resistencia a las proteasas, vida media e interacción con otros factores o moléculas, tales como FX y FIX. Polipéptidos FVII modificados que contienen estas modificaciones de combinación pueden tener actividad coagulante incrementada, duración incrementada de la actividad coagulante, y/o un índice terapéutico mejorado. Las modificaciones expuestas en la Tabla 12 posteriormente usan la

252

misma nomenclatura y sistemas de numeración como se describe en la Tabla 5 a la Tabla 11, anterior. Por ejemplo, la modificación "Gla Intercambio FIX" implica la supresión del dominio FVII Gla endógeno al suprimir los residuos de aminoácidos A1 a Y44 (residuos que corresponde a un polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3) y la inserción de 45 residuos de aminoácido que corresponden a los residuos aminoácidos Y1 a Y45 del dominio FIX Gaa expuesto en SEQ ID NO:83, como se describe anteriormente. En algunos ejemplos, la modificación "Gla Intercambio FIX" también contiene una o más sustituciones de aminoácidos en la porción de dominio FIX Gla comparado con el dominio FIX Gla de tipo silvestre, como se plantea anteriormente. Por ejemplo, la modificación Gla Intercambio FIX también puede incluir una sustitución de aminoácidos M19K (numeración que corresponde aminoácido positions del dominio FIX Gla expuesto en SEQ ID NO:83). Esta modificación se indica por {Gla Intercambio FIX/MI 9K}, es decir, el polipéptido FVII modificado contiene un dominio FIX Gla heterólogo en el cual la metionina en la posición que corresponde a la posición 19 del dominio FIX Gla expuesto en SEQ ID NO:83 se reemplaza con una lisina. De esta manera, las modificaciones hechas a las porciones del dominio FIX Gla heterólogo son referenciadas usando posiciones de aminoácidos que corresponden a las posiciones de aminoácidos del polipéptido FIX de tipo silvestre maduro, o el dominio FIX Gla de tipo silvestre expuesto en SEQ ID NO:83. Las modificaciones hechas a las posiciones de aminoácidos en el polipéptido FVII son referenciadas usando posiciones de aminoácidos que

253

corresponde a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FVII maduro como se expone en SEQ ID NO:3 y también se refiere por el esquema de numeración de quimotripsina. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado que contiene la modificación Q286R (numeración que corresponde al Polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3), y una modificación Gla Intercambio FIX, en donde el dominio FIX Gla contiene la sustitución de aminoácidos M19K (numeración que corresponde a las posiciones de aminoácidos del dominio FIX Gla expuesto en SEQ ID NO:83), se indica por {Gla Intercambio FIX/M19K}/Q286R. Similarmente, la modificación {Gla Intercambio FIX/Q44S}/Q286R/M298Q indica que el polipéptido FVII contiene una modificación Gla Intercambio FIX en donde la glutamina en la posición de aminoácidos que corresponde a la posición de aminoácidos 44 del dominio FIX Gla expuesto en SEQ ID NO:83 se reemplaza con una serina, y también contiene las sustituciones de aminoácidos Q286R y M298Q, con la numeración que corresponde al polipéptido FVII maduro expuesto en SEQ ID NO:3. En la Tabla 12 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el cual secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido FVII modificado se exponen.

Tabla 12.

Modificación - numeración de FVII maduro	Modificación - numeración de quimotripsina	SEQ ID NO
Gla Intercambio FIX/Q286R	Gla Intercambio FIX/Q143R	131
Q286R/H257A	H117A/Q143R	132
S222A/Q286R	S82A/Q143R	133
Q286R/S222A/H257A	S82A/H117A/Q143R	134

254

Gla Intercambio FIX /S222A/Q286R	S82A/Gla Intercambio FIX/Q143R	135
Gla Intercambio FIX/H257A/Q286R	H117A/Gla Intercambio FIX/Q143R	136
Gla Intercambio FIX /S222A/H257A/Q286R	Q143R/S82A/H117A/Gla Intercambio FIX	137
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	138
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q	139
K199E/Q286R/M298Q	K60cE/Q143R/M156Q	140
Gla Intercambio FIX/Q286R/M298Q	Gla Intercambio FIX/Q143R/M156Q	141
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V	142
Q286R/A292N/A294S/Q366V	Q143R/A150N/A152S/Q217V	143
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	144
S222A/Q286R1Q366V	S82A/Q143R/Q217V	145
H257S/Q286R	H117S/Q143R	146
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	147
S222A/H257A/Q286R/Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	148
Q286R/H373A	Q143R/H224A	149
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	150
Q286R/K341D	Q143R/K192D	151
Q286R/Q366D	Q143R/Q217D	152
Q286R/Q366N	Q143R/Q217N	153
Q286R/M298Q/Q366D	Q143R/M156Q/Q217D	154
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	155
Q286R/H373F	Q143R/H224F	156
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	157
Gla Intercambio FIX/S222A	Gla Intercambio FIX/S82A	245
Gla Intercambio FIX/H257A	Gla Intercambio FIX/H117A	246
Gla Intercambio FIX/S222A/H257A	Gla Intercambio FIX/S82A/H117A	247
S222A/M298Q	S82A/M156Q	248
H257A/M298Q	H117A/M156Q	249
S222A/H257A/M298Q	S82A/H117A/M156Q	250
S222A/A292N/A294S/Q366V	S82A/A150N/A152S/Q217V	251
A175S/S222A/Q366V	A39S/S82A/Q217V	252
S222A/Q366V	S82A/Q217V	253
H257S/Q366V	H117S/Q217V	254
S222A/H373A	S82A/H224A	255
V158T/L287T/M298K	V21T/L144T/M156K	256
V158D/L287T/M298K	V21D/L144T/M156K	257
S103S111delinsIEDICLPRWGCLW	5[103]S[111]delinsTEDICL	258

E/G237V	PRWG CLWE/G97V	
S103S111delinsDICLPRWGCLWED /G237V	S[103]S[111]delinsDICLPR WGC LWED/G97V	259
H115S126delinsQRLMEDICLPRWG CLWEDDF/G237V	H[115]S[126]delinsQRLMED ICL PRWGCLWEDDF/G97V	260
H115S126delinsIEDICLPRWGCLW E/G237V	H[115]S[126]delinsIEDICL PRWG CLWE/G97V	261
H115S126delinsDICLPRWGCLWE D/G237V	H[115]S[126]delinsDICLPR WGC LWED/G97V	262
T128P134delinsQRLMEDICLPRWG CLWEDDF/G237V	T[128]P[134]delinsQRLMED ICLPRWGCLWEDDF/G97V	263
T128P134delinsIEDICLPRWGCLW E/G237V	T[128]P[134]delinsIEDICL PRWG CLWE/G97V	264
S1035111delinsQRLMEDICLPRWG CLWEDDF/G237V	S[103]S[111]delinsQRLMED ICL PRWGCLWEDDF/G97V	265
T128P134delinsDICLPRWGCLWED /G237V	T[128]P[134]DICLPRWGCLWE D/G97V	266
S103S111delinsSFGRGDIRNV/G237 V	S[103]S[111]delinsSFGRGD IRNV/G97V	267
H115S126delinsSFGRGDIRNV/G23 7V	H[115]S[126]delinsSFGRGD IRN V/G97V	268
T128P134delinsSFGRGDIRNV/G23 7V	T[128]P[134]delinsSFGRGD IRN V/G97V	269
M298Q/H373F	M156Q/H224F	270
S119N/L121S/A175S	S[119]N[L[121]S/A39S	271
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	272
A122N/G1245/A175S	A[122]N/G[124]S/A395	273
{Gla Intercambio FIX IE40L}/Q286R/M298Q	{Gla Intercambio FIX /E[40]L}/Q143R/M156Q	274
{Gla Intercambio FIX /K431}/Q286R/M298Q	{Gla Intercambio FIX/K[43]I}/Q143R/M156Q	275
{Gla Intercambio FIX/Q44S}/Q286R/M298Q	{Gla Intercambio FIX/Q[44]S}/Q143R/M156Q	276
{Gla Intercambio FDI/M19K}/Q286R/M298Q	{Gla Intercambio FIX /M[19]K}/Q143R/M156Q	277
{Gla Intercambio FIX /M19K/E40L/K431/Q44S}/Q286R/M 298Q	{GlaIntercambioFIX/M[19]K /E[40]L/K[43/IQ[44]S}/Q14 3R/ M156Q	278
T128N/P129A/Q286R	T[128]N/P[129]A/Q143R	279
T128N/P129A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/Q143R/M15 6Q	280
T128N/P129A/Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H22	281

256

	4F	
V158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V1M156Q	282
T128N/P129A/V158D1E296V1M298 Q	T[128]N/P[129]A/V21D/E154V/M156Q	283
T128N/P129A/S222A	T[128]N/P[129]A/S82A	284
GlaIntercambioFIX/T128N/P129A/S222A/ Q286R	GlaIntercambioFIX/T[128]N/P[129JA/S82A/Q143R	285
GlaIntercambioFIX/T128N/P129A/Q286R/ M298Q	GlaIntercambioFIX/T{128]N/P[129]A/Q 143R/M156Q	286
T128N/P129A1S222A/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/H117A/Q143R/M156Q	287
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373 F	T[128]N/P[129/A/Q143R/M156Q/ H224F	288
S52A/S60A/V158D/E296V/M298Q	S[52]A/S[60]AJV21D/E154V/M156Q	289
S52A/S60A/Q286R	S[52]A/S[60]A/Q143R	290
S52A/S60A/S222A	S[52]A/S[60/A/S82A	291
GlaIntercambioFIX/S52A/S60A/S222A/Q2 86R	GlaIntercambioFIX/S[52]A/S [60]A/S82A/Q143R	292
S52A/S60A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q	293
GlaIntercambioFIX/S52A/S60A/Q286R/M2 98Q	GlaIntercambioFIX/S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q	294
S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H117Q143R/M156Q	298
S52A/S60A/Q286R/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/H224F	296
S52A/S60A/Q286R/M298Q/H373F	S[52]A]S[60]A/Q143R/M156Q/H224F	297
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	298
T239V/Q286R	T99V/Q143R	299
S222A/T239V	S82A/T99V	300
Gla Intercambio FIX/S222A/T239V/Q286R	Gla Intercambio FIX/S82A/T99V/Q143R	301
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	302
S222A/T239V/F1257A/Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/M156 Q	303
GlaIntercambioFIX/T239V/Q286R/M298Q	GlaIntercambioFIX/T99V/Q143R/M156 Q	304
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	305
T239V/Q286R/M298Q/H373F	T99V/Q143R/M156Q/H224F	306
V158D/T239UE296V/M298Q	V21D/T991I/E154V/M 156Q	307
T239I/Q286R	T99T/Q143R	308
S222A/T2391	S82A/T991	309

257

GlaIntercambioFIX/S222A/T239I/Q286R	GlaIntercambioFIX/S82A/T99L/Q143R	310
T239I/Q286R/M298Q	T99I/Q143R/M156Q	311
S222A/T239I/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99I/H117A/Q143R/M156 Q	312
GlaIntercambioFIXIT239I/Q286R/M298Q	GlaIntercambioFIX/T99I/Q143R/M156Q	313
T239I/Q286R/H373F	T99I/Q143R/H224F	314
T239I/Q286R/M298Q/H373F	T99I/Q143R/M156Q/H224F	315
GlaIntercambioFIX/S222A/Q286R/H373F	GlaIntercambioFIX/S82A/Q143R/H224F	316
GlaIntercambioFIX/S222A/Q286R/M298Q	GlaIntercambioFIX/S82A/Q143R/M 156 Q	317
GlaIntercambioFIX/S222A/Q286R/M298Q/ H373F	GlaIntercambioFIX/S82A/Q143R/M 156Q[11224F	318
V158D/E296V/M298Q/H373F	V21D/E154V/M156Q/H224F	319
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373 F	V2ID/Q143R/E154V/M156Q/H224F	320
H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	321
H257S/Q286R/M298Q	H117S/Q143R/M156Q	322
GlaIntercambioFIX/S222A/H257S/Q286R	GlaIntercambioFIX/S82A/H117S/Q143R	323
S222A/H257S/Q286R/M298Q	S82A/H117S/Q143R/M156Q	324
H257S/Q286R/M298Q/H373F	H117S/Q143R/M156Q/H224F	325
S222A/Q286R/M298Q/H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	326
GlaIntercambioFIX/Q366V	GlaIntercambioFIX/Q217V	327
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	328
T128N/P129A/A175S/Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/Q217V	329
A122N/G124S/A175S/Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/Q217V	330
T128N/P129A/A175S/S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A	331
A122N/G124S/A175S/S222A	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A	332
T128N/P129A/A175S/Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R	333
A122N/G124S/A175S/Q286R	A[122]N/G[124]S/A39/Q143R	334
GlaIntercambioFIX/T128N/P129A/A175S/S 222A/Q286R	GlaIntercambioFIX/T[128]N/P[129]A/A 9S/S82A/Q143R	335
GlaIntercambioFIX/A122N/G124S/A175S/ S222A/Q286R	GlaIntercambioFIX/A[122]N/G[124] S/A39S/S82A/Q143R	336
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298 Q	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M 156Q	337

258

A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q	338
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	339
A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/H117A/Q143R!M156Q	340
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156Q/H224F	341
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q/H224F	342
T128N/P129A1M298Q	T[128]N/P[129]A/M156Q	354
{Gla Intercambio FIX /K431}/T128N/P129A/Q286R/M298Q	{Gla Intercambio FIX/K[43]I}/ T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	355
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366 N	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/ Q217N	356
{Gla Intercambio FIX /K431}/Q286R/M298Q/Q366N	{Gla Intercambio FIX /K[43]I}/Q143R/M156QQ217N	357
{Gla Intercambio FIX 1K431}/T128N/P 129A/Q286R/M298Q/Q366 N	{Gla Intercambio FIX/K[43]I}/ T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q Q217N	358
T128N/P129A/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/M156Q/H224F	359
V158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	360
M298Q/Q366N/H373F	M156Q/Q217N/H224F	361
T239V/M298Q/H373F	T99V/M156Q/H224F	362
T2391/M298Q/H373F	T991/M156Q/H224F	363
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/ Q217N/H224F	364
T239V/Q286R/M298Q/Q366N	T99V/Q143R/M156Q/Q217N	365
T239I/Q286R/M298Q/Q366N	T99I/Q143R/M156Q/Q217N	366
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298 Q	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q	367
T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q	368
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q/11224F	369
T128N/P129A/T239L/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M 156Q	370
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M 156Q/H224F	371

259

E. Producción de polipéptidos FVII

Los polipéptidos FVII, que incluyen polipéptidos FVII modificados, o dominios de los mismos de FVII u otro polipéptido de vitamina K, se pueden obtener mediante métodos bien conocidos en el campo para la purificación de proteínas y expresión de proteínas recombinantes. Cualquier método conocido por aquellas personas expertas en el campo para la identificación de ácidos nucleicos que codifican genes deseados se pueden usar. Cualquier método disponible en el campo se puede usar para obtener un ADNc de longitud completa (*es decir*, que abarca la región de codificación completa) o clon de ADN genómico que codifica un polipéptido FVII u otro polipéptido de vitamina K, tal como de una célula o fuente de tejido, tal como por ejemplo del hígado. Los polipéptidos FVII modificados se pueden diseñar como se describe en este documento, tal como mediante la mutagénesis dirigida en el sitio.

El FVII se puede clonar o aislar usando cualquiera de los métodos disponibles conocidos en el campo para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Estos métodos incluyen amplificación PCR de ácidos nucleicos y clasificación de bibliotecas, que incluyen clasificación de hibridación de ácidos nucleicos, clasificación basada en anticuerpos y clasificación basada en actividad.

Los métodos para la amplificación de ácidos nucleicos se pueden usar para aislar moléculas de ácido nucleicos que codifican un polipéptido FVII, que incluye por ejemplo, métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Un material que

260

contiene ácidos nucleicos se puede usar como un material de partida del cual una molécula de ácido nucleico que codifica FVII se puede aislar. Por ejemplo, preparaciones de ADN y ARNm, extractos de células, extractos de tejidos (*por ejemplo*, del hígado), ejemplos de fluidos (*por ejemplo*, sangre, suero, saliva), muestras de sujetos sanos y/o enfermos se pueden usar en los métodos de amplificación. Las bibliotecas de ácidos nucleicos también se pueden usar como una fuente de materia de partida. Los cebadores se pueden diseñar para amplificar una molécula que codifica FVII. Por ejemplo, los cebadores se pueden diseñar con base en las secuencias expresadas de las cuales un FVII se genera. Los cebadores se pueden diseñar con base en la traducción posterior de una secuencia de aminoácidos FVII. Las moléculas de ácidos nucleicos generadas por la amplificación se pueden secuenciar y confirmar para codificar un polipéptido FVII.

Las secuencias de nucleótidos adicionales se pueden unir a una molécula de ácido nucleico que codifica FVII, que incluye secuencias enlazadoras que contienen sitios de endonucleasa de restricción para el propósito de clonar el gen sintético dentro de un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteína o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias de ADN de codificación de proteína del núcleo. Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales se pueden enlazar operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica FVII. Ejemplos de estas secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias de promotor diseñadas para facilitar la expresión de proteínas

261

intracelulares, y las secuencias de secreción diseñadas para facilitar la secreción de proteínas. Secuencias de nucleótidos adicionales, tales como las secuencias que especifican las regiones de enlace de proteínas también se pueden enlazar a las moléculas de ácido nucleico que codifican FVII. Estas regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias para facilitar la captación de FVII en dentro de las células objetivo específicas, o de otra manera mejorar la farmacocinética del gen sintético.

Los ácidos nucleicos identificados y aislados luego se pueden insertar dentro de un vector de clonación apropiado. Una gran variedad de sistemas de vector-hospedero conocidos en el campo se puede usar. Vectores posibles incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula hospedera usada. Estos vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tales como derivados lambda, o plásmidos tales como derivados de plásmido pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). La inserción dentro de un vector de clonación puede, por ejemplo, ser lograda al ligar el fragmento de ADN dentro de un vector de clonación el cual tiene términos complementarios cohesivos. La inserción se puede efectuar usando vectores de clonación TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN se pueden modificar enzimáticamente. Alternativamente, cualquier sitio deseado se puede producir al ligar las secuencias de nucleótidos

262

(enlazadores) sobre las terminales de ADN; estos enlazadores ligados pueden contener oligonucleótidos sintetizados químicamente específicos que codificación las secuencias de reconocimiento de la endonucleasa de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen de proteína FVII se pueden modificar por la cola homopolimérica. Las moléculas recombinantes se pueden introducir en las células hospederas por la vía, por ejemplo, de la transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se pueden generar muchas copias de la secuencia de genes.

En modalidades específicas, la transformación de las células hospederas con las moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen de proteína FVII aislado, ADNc, o secuencia de ADN sintetizado permite la generación de múltiples copias del gen. De esta manera, el gen se puede obtener en grandes cantidades a desarrollar transformantes, al aislar las moléculas de ADN recombinantes de los transformantes y, cuando sea necesario, al recuperar el gen insertado del ADN recombinante aislado.

1. Vectores y Células

Para la expresión recombinante de una o más de las proteínas FVII, el ácido nucleico que contiene todo o una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína FVII se puede insertar dentro de un vector de expresión apropiado, *es decir*, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación de proteínas insertas. Ejemplar de este vector es cualquier vector de expresión de mamífero, tal como, por

263

ejemplo, pCMV. Las señales transcripcionales y traduccionales necesarias también se pueden suministrar por el promotor nativo para unos genes FVII, y/o sus regiones de flanqueo.

También se proporcionan vectores que contienen ácido nucleico que codifica el FVII o FVII modificado. Las células que contienen los vectores también se proporcionan. Las células incluyen células eucarióticas y procarióticas, y los vectores son cualquier adecuado para el uso en este documento.

Se proporcionan células procarióticas y eucarióticas, que incluyen las células endoteliales, que contienen los vectores. Estas células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, Archea, células de plantas vegetales, células de insectos y células de animal. Las células se usan para producir un polipéptido FVII o polipéptido FVII modificado del mismo para desarrollar las células descritas anteriormente bajo condiciones mediantes las cuales la proteína FVII codificada se expresa por la célula, y recuperando la proteína FVII expresada. Para propósitos en este documento, el FVII se puede secretar en el medio.

En una modalidad, se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una actividad FVII y contiene toso o una porción del polipéptido FVII, o múltiples copias del mismo. Los vectores se pueden seleccionar para la expresión del polipéptido FVII o polipéptido FVII modificado del mismo en la célula o tal que la proteína FVII se expresa como una proteína secretada. Cuando el FVII se expresa el ácido nucleico se enlaza al ácido nucleico que codifica una señal de secreción, tal como la secuencia del

264

factor α-unión *Saccharomyces cerevisiae* o una porción del mismo, o la secuencia de señal nativa.

Una variedad de sistemas de hospedero-vector se pueden usar para expresar la secuencia de codificación de proteínas. Estos incluyen, pero no se limitan a sistemas de células de mamíferos infectadas con su virus, (*por ejemplo* virus de vaccinia, adenovirus y otros virus); sistemas de células de insectos infectados con virus (*por ejemplo*, baculovirus); microorganismos tal como vectores de levadura que contienen levadura; o bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN plásmido, ADN cósmido. Los elementos de expresión de los vectores varían en sus resistencias y especificidades. Dependiendo del sistema hospedero-vector usado, se pueden usar cualquiera de una variedad de elementos de transcripción y traducción adecuados.

Cualquiera de los métodos conocidos por aquellas personas expertas en el campo para la inserción de fragmentos de ADN dentro de un vector se pueden usar para construir vectores de expresión que contiene un gen quimérico que contiene señales de control transcripcionales/traduccionales apropiados y secuencias de codificación de proteínas. Estos métodos pueden incluir ADN recombinante *in vitro* y técnicas sintéticas y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de las secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido FVII o un polipéptido FVII modificado, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos, se pueden regular por una segunda secuencia de ácidos nucleicos de modo que los genes o fragmentos de los mismos se expresan en un hospedero

265

transformado con la(s) molécula(s) de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas se puede controlar por cualquier promotor / potenciador conocido en el campo. En una modalidad específica, el promotor no es nativo a los genes para una proteína FVII. Los promotores que se pueden usar incluyen pero no se limitan a el promotor temprano SV40 (Bernoist y Chambon, *Nature 290*:304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición 3' larga terminal del virus de sarcoma Rous (Yamamoto y colaboradores, *Cell. 22*:781-791 (1980)), el promotor de timidina cinasa de herpes (Wagner, *y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci EUA 78*:1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster *y colaboradores, Nature 296*:39-42 (1982)); vectores de expresión procarióticos tal como el promotor β-lactamasa (Jay *y colaboradores*, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci EUA* 75:5543) o el promotor tac (DeBoer *y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci EUA 80*:21-25 (1983)); véase también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": in Scientific American *242*:79-94 (1980)); vectores de expresión de plantas que contienen el promotor de nopalina sintetasa (Herrar-Estrella *y colaboradores, Nature 303*:209-213 (1984)) o el promotor 35S RNA del virus de mosaico de la coliflor (Garder *y colaboradores, Nucleic Acids Res. 9*:2871 (1981)), y el promotor de ribulosa bifosfato carboxilasa de la enzima fotosintética (Herrera-Estrella *y colaboradores, Nature 310*:115-120 (1984)); elementos de promotor de la levadura y otros hongos tales como el promotor Gal4, el promotor de alcohol deshidrogenasa, el promotor de fosfoglicerol cinasa, el promotor de fosfatasa

266

alcalina, y las siguientes regiones de control transcripcional de animal que exhiben especificidad de tenido y se han usado en animales transgénicos: la región de control del gen elastasa I el cual es activo en las células acinares pancreáticas (Swift *y colaboradores, Cell 35*:639-646 (1984); Ornitz *y colaboradores, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol 50*:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology* 7:425-515 (1987)); región de gen de insulina el cual está active en las células beta pancreáticas (Hanahan *y colaboradores, Nature 315*:115-122 (1985)), región de control del gen de inmunoglobulina el cual es activo en las células linfoides (Grosschedl *y colaboradores, Cell 35*:647-658 (1984); Adams *y colaboradores, Nature 318*:533-538 (1985); Alexander *y colaboradores, Mol. Cell Biol.* 7:1436-1444 (1987)), región de control del virus de tumor mamario de ratón el cual está activo en las células testiculares, de seno, linfoides y mastocitos (Leder *y colaboradores, Cell 45*:485-495 (1986)), región de control de gen de albúmina el cual está activo en hígado (Pinckert *y colaboradores, Genes and Devel.* 7:268-276 (1987)), región de control del gen de alfa-fetoproteína el cual está activo en el hígado (Krumlauf *y colaboradores, Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648 (1985); Hammer *y colaboradores, Science 235*:53-58 1987)), región de control del gen alfa-1 antitripsina el cual está activo en el hígado (Kelsey *y colaboradores, Genes and Devel.* 7:161-171 (1987)), región de control del gen de beta globina el cual está activo en las células mieloides (Mogram *y colaboradores, Nature 375*:338-340 (1985); Kollias *y colaboradores, Cell 46*:89-94 (1986)), la región de control del gen de proteína básica de mielina el cual está activo en las

células de oligodendrocitos del cerebro (Readhead *y colaboradores, Cell 45*:703-712 (1987)), región de control del gen de cadena ligera-2 de miosina el cual está activo en el músculo esquelético (Shani, *Nature 374*:283-286 (1985)), y región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica el cual está activo en los gonadótrofos del hipotálamo (Mason *y colaboradores, Science 234*:1372-1378 (1986)).

En una modalidad específica, se usa un vector que contiene un promotor operablemente enlazado a ácidos nucleicos que codifican una polipéptido FVII o polipéptido FVII modificado, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo, del mismo, uno o más orígenes de replicación, y opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (*por ejemplo* un gen de resistencia a antibióticos). Los vectores y sistemas para la de expresión de polipéptidos FVII incluyen los vectores Pichia bien conocidos (disponibles, por ejemplo, de Invitrogen, San Diego, CA), particularmente aquellos diseñados para la secreción de las proteínas codificadas. Los vectores de plásmido ejemplares para la expresión en las células de mamíferos incluyen, por ejemplo, pCMV. Vectores de plásmido ejemplares para transformación de células *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponible de Qiagen, Valencia, CA; véase también la literatura publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor fago T5 (reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*) y un módulo de represión operador lac doble para proporcionar una expresión de alto nivel, estrechamente regulada de proteínas recombinantes

268

en *E. coli*, un sitio de enlace ribosomal sintético (RBS II) para la traducción eficiente, una secuencia de codificación 6xHis tag, terminadores transcripcionales t_0 y T1, origen ColE1 de replicación, y un gen de beta-lactamasa para conferir resistencia a la ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de un 6xHis en ya sea la N- o C-terminal de la proteína recombinante. Estos plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30, y pQE 31, los cuales proporcionan múltiples sitios de clonación para los tres marcos de lectura y proporcionan la expresión de las proteínas N-terminalmente de 6xHis-tag. Otros vectores del plásmido ejemplares para la transformación de células de *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, la Patente de EUA 4,952,496; disponible en NOVAGEN, Madison, WI; véase, también la literatura publicada por Novagen que describe el sistema). Estos plásmidos incluyen pET 11a, el cual contiene el promotor T7lac, el terminador T7, el operador lac de *E. coli* inducible, y el gen represor lac; pET 12a-c, el cual contiene el promotor T7, el terminador T7, y la señal de secreción ompT de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (Novagen, Madison, WI), los cuales contienen una secuencia líder His-Tag^{MR} para el uso en la purificación con una columna His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de la purificación sobre la columna, la región del promotor T7-lac y el terminador T7.

2. Sistemas de Expresión

Los polipéptidos FVII (modificados y no modificados) se pueden producir mediante cualquiera de los métodos conocidos en el campo para la producción de proteínas que incluyen métodos

269

in vitro e *in vivo*, tales como, por ejemplo, la introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican el FVII dentro de una célula hospedera, animal hospedero y expresión de las moléculas de ácido nucleico que codifican FVII *in vitro*. El FVII y los polipéptidos FVII modificados se pueden expresar en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades requeridas y las formas de un polipéptido FVII necesaria para la administración y el tratamiento. Los hospederos de expresión incluyen organismos procarióticos y eucarióticos, tales como *E. coli*, levadura, plantas, células de insectos, células de mamífero, que incluyen líneas de células humanas y animales transgénicos. Los hospederos de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas, así como también los tipos de modificaciones post-traduccionales que están presentes sobre las proteínas expresadas. La selección del hospedero de expresión se puede hacer con base en estos y otros factores, tales como consideraciones reguladoras y de seguridad, costos de producción y la necesidad y métodos para la purificación.

La expresión en hospederos eucarióticos pueden incluir la expresión en las levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia Pastoria*, células de insectos tales como células de *Drosophila* y células de *lepidopteran*, plantas y células de plantas tales como tabaco, maíz, arroz, algas y lemna. Las células eucarióticas de expresión también incluyen líneas de células de mamíferos tales como células de ovario de hámster Chino (CHO) o células de riñón de hámster bebe (BHK). Los hospederos de expresión eucarióticos también incluyen la producción en animales transgénicos, por ejemplo, incluyendo la

producción en suero, leche y huevos. Los animales transgénicos para la producción de polipéptidos FVII de tipo silvestre son conocidos en el campo (Publicaciones de Patente de EUA Nos. 20020166130 y 20040133930) y se pueden adaptar para la producción de polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento.

Muchos vectores de expresión están disponibles y conocidos por aquellas personas expertas en el campo para la expresión de FVII. La selección del vector de expresión se afecta por la selección del sistema de expresión hospedero. Esta selección está muy dentro del nivel de experiencia del artífice experto. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores transcripcionales y opcionalmente, potenciadores, señales traduccionales, y señales de terminación transcripcionales y traduccionales. Los vectores de expresión que se usan para la transformación estable tienen típicamente un marcador seleccionable el cual permite la selección y mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, un origen de replicación se puede usar para ampliar el número de copias de los vectores en las células.

El FVII o los polipéptidos FVII modificados también se pueden usar o expresar como fusiones de proteínas. Por ejemplo, una fusión se puede generar para agregar funcionalidad adicional a un polipéptido. Ejemplos de proteínas de fusión incluyen, pero no se limitan a, fusiones de una secuencia de señal, una etiqueta tal como para la localización, por ejemplo, una His6 tag o una myc tag, o una etiqueta para la purificación, por ejemplo, una fusión GST, y una secuencia para

231

dirigir la dirección de proteínas y/o asociación de membranas.

En una modalidad, el polipéptido FVII o los polipéptidos FVII modificados se puede expresar en una forma activa, mediante la cual la activación se logra por la autoactivación del polipéptido después de la secreción. En otra modalidad, la proteasa se expresa en una forma de zimógeno inactiva.

Los métodos de producción de los polipéptidos FVII pueden incluir co-expresión de uno o más polipéptidos heterólogos adicionales que pueden ayudar en la generación de los polipéptidos FVII. Por ejemplo, estos polipéptidos puedan contribuir al procesamiento post-traduccional de los polipéptidos FVII. Polipéptidos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, peptidasas que ayudan a escindir las secuencias del precursor FVII, tal como la secuencia de propéptidos, y enzimas que participan en la modificación del polipéptido FVII, tal como mediante la glicosilación, hidroxilación, carboxilación, fosforilación, por ejemplo. Una peptidasa ejemplar que se pueden co-expresar con FVII es PACE / furina (o PACE-SOL), la cual ayuda en la escisión de la secuencia de propéptido FVII. Una proteína ejemplar que ayuda en la carboxilación del polipéptido FVII es la 2,3-epóxido reductasa de vitamina K de enzima sensible a la warfarina (VKOR), la cual produce vitamina K reducida para la utilización como un cofactor por la γ-carboxilasa dependiente de la vitamina K (Wajih *y colaboradores, J. Biol Chem* 280(36)31603-31607). Una subunidad de esta enzima, VKORC1, se puede co-expresar con el polipéptido FVII modificado para incrementar la γ-carboxilación. El uno o más polipéptidos adicionales se pueden expresar del mismo

272

vector de expresión como el polipéptido FVII o de un vector diferente.

a. Expresión procariótica

Las procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de FVII (*véase*, por ejemplo, Platis *y colaboradores* (2003) Protein Exp. Purif. 31(2):222-30; y Khalilzadeh *y colaboradores* (2004) J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31(2):63-69). La transformación de *E. coli* es una técnica simple y rápida bien conocida por aquellas personas expertas en el campo. Los vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles que son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteínas y para expresar proteínas que exhiben alguna toxicidad a las células hospederas. Ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor lac, el promotor trp, el promotor tac híbrido, los promotores T7 y SP6 RNA y el promotor λP_L regulado con temperatura.

El FVII se puede expresar en el medio ambiente citoplasmático de *E. coli*. El citoplasma es un medio ambiente de reducción y para algunas moléculas, esto puede dar por resultado la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Los agentes de reducción tales como ditiotreitol y β-mercaptoetanol y desnaturalizantes (*por ejemplo*, tal como guanidina-HCl y urea) se pueden usar para resolubilizar las proteínas. Un procedimiento alternativo es la expresión de FVII en el espacio periplásmico de las bacterias lo cual proporciona un medio ambiente oxidante e isomerasas similares a chaperonina y de disulfuro que conducen a la producción de la proteína soluble.

273

Típicamente, una secuencia líder se fusiona a la proteína que se expresa lo cual dirige la proteína al periplasma. El líder luego se remueve por las peptidasas de señal dentro del periplasma. Ejemplos de secuencias líder objetivo periplásmicas incluyen el líder pelB del gen de liasa pectato y el líder derivado del gel de fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la fuga de la proteína expresada dentro del medio de cultivo. La secreción de proteínas permite una purificación rápida y simple del sobrenadante de cultivo. Las proteínas que no se secretan se pueden ser obtener del periplasma mediante la lisis osmótica. Similar a la expresión citoplasmática, en algunos casos, las proteínas se pueden llegar a ser insolubles y desnaturalizantes y agentes de reducción se pueden usar para facilitar la solubilización y replegamiento. La temperatura de inducción y crecimiento también puede afectar los niveles de expresión y la solubilidad. Típicamente, las temperaturas entre 25°C y 37°C se usan. Las mutaciones también se pueden usar para incrementar la solubilidad de las proteínas expresadas. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. De esta manera, si las proteínas requieren glicosilación para la fusión, la glicosilación se puede agregar *in vitro* después de la purificación de las células hospederas.

b. Levadura

Las levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Yarrowia lipolytica, Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son hospederos de expresión útiles para FVII (véase, por ejemplo, Skoko y *colaboradores* (2003)

2nd

Biotechnol. Appl. Biochem. 38(Pt3):257-65). La levadura se puede transformar con vectores de replicación episomales o mediante la integración cromosomal estable por la recombinación homóloga. Típicamente, los promotores inducibles se usan para regular la expresión génica. Ejemplos de estos promotores incluyen GAL1, GAL7 y GAL5 y promotores de metalotioneína como CUP1. Los vectores de expresión incluyen frecuentemente un marcador seleccionable tal como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para la selección y mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en la levadura son frecuentemente solubles y la co-expresión con chaperoninas, tal como Bip y disulfuro isomerasa proteínica, pueden mejorar los niveles de expresión y solubilidad. Adicionalmente, las proteínas expresadas en la levadura se pueden dirigir para la secreción usando fusiones de péptido señal de secreción tal como la señal de secreción del factor alfa del tipo de acoplamiento de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de superficie celular de levadura tal como el receptor de adhesión de acoplamiento Aga2p o la glucoamilasa de *Arxula adeninivorans*. Un sitio de escisión de proteasa (por ejemplo, la Kex-2 proteasa) se puede diseñar para remover las secuencias fusionadas de los polipéptidos con forme salen de la vía de secreción. La levadura también es capaz de la glicosilación en un motivo Asn-X-Ser/Thr.

c. Insectos y células de insectos

Los insectos y células de insectos, que usan particularmente un sistema de expresión de baculovirus, son útiles para la expresión de polipéptidos tales como FVII o

000245

formas modificadas del mismo (*véase*, por ejemplo, Muneta *y colaboradores* (2003) J. Vet. Med. Sci. 65(2):219-23). Las células de insectos y larvas de insectos, que incluyen la expresión en la hemolinfa, expresan altos niveles de proteína y son capaces de la mayoría de las modificaciones post-traduccionales usadas por los eucariotas superiores. Los baculovirus tienen un intervalo de hospedero restrictivo que mejora la seguridad y reduce las preocupaciones reguladoras de la expresión eucariótica. Típicamente, los vectores de expresión usan un promotor tal como el promotor de polihedrina de baculovirus para la expresión a alto nivel. Los sistemas de baculovirus comúnmente usados incluyen baculovirus tales como virus poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), y virus poliedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea de células de insectos tales como Sf9 derivadas de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para la expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula que se expresa se fusiona inmediatamente corriente abajo del codón de iniciación de polihedrina del virus. Las señales de secreción de mamíferos se procesan con precisión en las células de insecto y se puede usar para secretar la proteína expresada dentro del medio de cultivo. Además, las líneas de células *Pseudaletia uN/Puncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a los sistemas de células de mamíferos.

Un sistema de expresión alternativo en las células de insecto es el uso de células establemente transformadas. Las

líneas de células tales como las células Schneider 2 (S2) y Kc (*Drosophila melanogaster*) y células C7 (*Aedes albopictus*) se puede usar para la expresión. El promotor de metalotioneína de Drosophila se puede usar para inducir altos niveles de expresión en presencia de la inducción de metal pesado con cadmio o cobre. Los vectores de expresión se mantienen típicamente por el uso de marcadores seleccionables, tales como neomicina e higromicina.

d. Células de mamífero

Los sistemas de expresión de mamíferos se pueden usar para expresar polipéptidos FVII. Los constructos de expresión se pueden transferir a las células de mamífero mediante la infección viral tal como adenovirus o mediante la transferencia de ADN directo tal como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos, tales como electroporación y microinyección.

Los vectores de expresión para las células de mamíferos incluyen típicamente un sitio cap de ARNm, una caja TATA, una secuencia de iniciación traduccional (secuencia consenso Kozak) y elementos de poliadenilación. Estos vectores incluyen frecuentemente la promotores-potenciadores transcripcionales para la expresión de alto nivel, por ejemplo el promotor-potenciador SV40, el promotor de citomegalovirus humano (CMV), y la repetición terminal larga del virus de sarcoma Rous (RSV). Estos promotores- potenciadores son activos en muchos tipos de células. También se pueden usar regiones de promotores y potenciadores de tipo de tejido de células para la expresión. Las regiones de promotor/potenciador ejemplar incluyen, pero no

se limitan a, aquellas de genes tal como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus del tumor mamario de ratón, albúmina, alfa-fetoproteína, alfa 1-antitripsina, beta-globina, proteína básica de mielina, cadena ligera-2 de miosina, y control de genes de hormona liberadora gonadotrópica. Los marcadores seleccionables se pueden usar para seleccionar y mantener células con el constructo de expresión. Ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, aminoglucósidos fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa y timidina cinasa. La fusión con las moléculas de señalización de la superficie celular tal como TCR-ζ y $Fc_{\varepsilon}RI$-γ pueden dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo sobre la superficie celular.

Muchas líneas de células están disponibles para la expresión de mamíferos que incluyen células de ratón, rata, humano, mono, y pollo y hámster. Las líneas de células ejemplares incluyen, pero no se limitan a, BHK (es decir, células BHK-21), 293-F, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, ratón NS0 (no secretor) y otras líneas de células de mieloma, líneas de células de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 293T, 2B8, y células HKB. Las líneas celulares también están disponibles adaptadas a los medios sin suero lo cual facilita la purificación de las proteínas secretadas del medio de cultivo de células. Un ejemplo es la línea de células EBNA-1 sin suero (Pham y *colaboradores,* (2003) *Biotechnol Bioeng.* 84:332-42). La expresión de los polipéptidos FVII recombinantes que exhiben

estructura similar y modificaciones post-traduccionales como FVII derivado de plasma son conocidos en el campo (*véase, por ejemplo*, Jurlander *y colaboradores*, (2003) Semin Throm Hemost). Son conocidos métodos para optimizar la expresión de proteína dependiente de la vitamina K. Por ejemplo, la suplementación de la vitamina K en medio de cultivo o co-expresión de γ-carboxilasas dependientes de la vitamina K (Wajih *y colaboradores, J. Biol. Chem.* 280(36)31603-31607) pueden ayudar en la modificación pos-traduccional de proteínas dependientes de la vitamina K, tal como polipéptidos FVII.

e. Plantas

Las células de plantas transgénicas y plantas se pueden usar para la expresión de FVII. Los constructos de expresión se transfieren típicamente a las plantas usando la transferencia de DDN directa tal como bombardeo de microproyectiles y transferencia medida por PEG dentro de los protoplastos, y con transformación mediada por Agrobacterium. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias de promotor y de potenciador, elementos de terminación de transcripcionales, y elementos de control traduccionales. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación se dividen usualmente entre hospederos dicotiledóneos, tales como Arabidopsis y tabaco, y hospederos monocotiledóneos, tal como arroz y maíz. Ejemplos de promotores de plantas usados para la expresión incluyen el promotor del virus de mosaico de la coliflor, el promotor de la nopalina sintasa, el promotor de ribosa bifosfato carboxilasa y promotores de ubiquitina y UBQ3. Marcadores seleccionables tal como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina

fosfotransferasa se usan frecuentemente para facilitar la selección y mantenimiento de las células transformadas. Las células de plantas transformadas se pueden mantener en cultivo como células, agregados (tejido calloso) o regeneradas en plantas completas. Debido a que las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación que las células de mamíferos, esto puede afectar la selección para producir FVII en estos hospederos. Las células de plantas transgénicas también pueden incluir algas diseñadas para producir proteínas (*véase*, por ejemplo, Mayfield *y colaboradores*, (2003) PNAS 100:438-442). Debido a que las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación diferentes que las células de mamíferos, esto puede afectar la selección para producir FVII en estos hospederos.

2. **Purificación**

Los métodos para la purificación de los polipéptidos FVII de las células hospederas dependen de las células hospederas seleccionadas y los sistemas de expresión. Para moléculas secretadas, las proteínas se purifican generalmente del medio de cultivo después de la remoción de las células. Para la expresión intracelular, las células se pueden lisar y las proteínas se purifican del extracto. Cuando los organismos transgénicos, tales como las plantas y animales transgénicos se usan para la expresión, se pueden usar tejidos u órganos como material de partida para hacer un extracto de células lisadas. Adicionalmente, la producción de animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en la leche o huevos, los cuales se pueden recolectar, y si es necesario además las

280

000250

proteínas se pueden extraer y purificar adicionalmente usando métodos estándar en el campo.

El FVII se puede purificar usando técnicas de purificación de proteínas estándar conocidas en el campo, que incluyen pero no se limitan a, SDS-PAGE, cromatografía de fracción de tamaño y exclusión de tamaño, precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de quelato y cromatografía de intercambio iónico. Por ejemplo, los polipéptidos FVII se pueden purificar mediante la cromatografía de intercambio aniónico. Ejemplar de un método para purificar polipéptidos FVII es mediante el uso de una columna de intercambio iónico que permite el enlace de cualquier polipéptido que tenga dominio Gla funcional, seguido por la elución en presencia de calcio (*Véase por ejemplo*, Ejemplo 2). También se pueden usar técnicas de purificación de afinidad para mejorar la eficiencia y pureza de las preparaciones. Por ejemplo, los anticuerpos, receptores y otras moléculas que se enlazan a FVII se pueden usar en la purificación de afinidad. En otro ejemplo, la purificación también se puede mejorar usando una columna de afinidad de TF soluble (STF) (Maun *y colaboradores* (2005) Prot. Sci. 14:1171-1180). Los con constructos de expresión también se pueden diseñar para agregar una etiqueta de afinidad tal como un epítopo myc, fusión GST o His6 y afinidad purificada con el anticuerpo myc, resina de glutationa, y Ni-resina, respectivamente, a una proteína. La pureza se puede estimar mediante cualquier método conocido en el campo, incluyendo electroforesis en gel y tinción y técnicas espectrofotométricas.

281

000251

La proteasa FVII se puede expresar y purificar para estar en una forma inactiva (forma de zimógeno) o, alternativamente, la proteasa expresada se puede purificar dentro de una forma activa, tal como mediante autocatálisis. Por ejemplo, los polipéptidos FVII que se han activado por la vía de la escisión proteolítica del Arg^{152}-Ile^{153} se pueden preparar *in vitro* (es decir, FVIIa, forma de dos cadenas). Los polipéptidos FVII primero se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos de producción descritos en este documento, que incluyen pero no se limitan a, producción en las células de mamíferos seguidos por la purificación. Escisión de los polipéptidos FVII dentro de la forma de proteasa activa, FVIIa, se puede lograr por diferentes medios. Por ejemplo, la autoactivación durante la incubación con vesículas de fosfolípido en presencia de calcio se puede lograr en 45 minutos (Nelsestuen *y colaboradores*, (2001) *J Biol Chem* 276:39825-31). Los polipéptidos FVII también se pueden activar para la terminación mediante la incubación con el factor Xa, factor XII, o TF en presencia de calcio, con o sin fosfolípidos (*véase, por ejemplo*, Ejemplo 2 Broze *y colaboradores*, (1980) J Biol Chem. 255:1242-1247, Higashi y colaboradores, (1996) J Biol Chem 271:26569-26574, Harvey y colaboradores J Biol Chem. 278:8363-8369).

3. Proteínas de Fusión

Las proteínas de fusión que contienen un polipéptido FVII modificado y uno o más de otros polipéptidos también se proporcionan. Se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen estas proteínas de fusión formuladas para la administración mediante una vía adecuada. Las proteínas de

282

000252

fusión se forman al enlazar en cualquier orden el polipéptido FVII Modificado y un agente, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, factor de crecimiento, receptor, ligando, y otro de este agente para los propósitos de facilitar la purificación de un polipéptido FVII, alterando las propiedades farmacodinámicas de un polipéptido FVII al dirigir, por ejemplo, al dirigir un polipéptido a una células o tenido objetivo, y/o al incrementar la expresión o secreción del polipéptido FVII. Típicamente, cualquier proteína de fusión FVII retiene por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% actividad coagulante comparado con un polipéptido FVII no de fusión, que incluye 96%, 97%, 98%, 99% o mayor actividad coagulante comparado con un polipéptido no de fusión.

El enlace de un polipéptido FVII con otro polipéptido se puede efectuar directa o indirectamente por la vía de un enlazador. En un ejemplo, el enlace puede ser mediante el enlace químico, tal como por la vía de agentes heterobifuncional o enlaces de tiol u otros enlaces. La fusión también se puede efectuar por medios recombinantes. La fusión de un polipéptido FVII a otro polipéptido puede ser a la N- o C-terminal del polipéptido FVII. Ejemplos no limitantes de polipéptidos que se pueden usar en las proteínas de fusión con un polipéptido FVII proporcionado en este documento incluyen, por ejemplo, un polipéptido GST (glutationa S-transferasa), dominio Fc de inmunoglobulina G, o una secuencia de señal heteróloga. Las proteínas de fusión puede contener componentes adicionales, tal como la proteína de enlace de maltosa *E. coli* (MBP) que ayuda en la captación de la proteína por las células

000253

(véase, Solicitud de PCT Internacional No. WO 01/32711).

Una proteína de fusión se puede producir mediante técnicas recombinantes estándares. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican la secuencia de polipéptido diferentes se pueden ligar conjuntamente dentro del marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, al emplear términos de extremo resultado o de extremo escalonado para la ligación, la digestión de enzimas de restricción para proporcionar términos apropiados, rellenado de extremos cohesivos como sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable, y ligación enzimática. En otra modalidad, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación de PCR de los fragmentos de genes se pueden llevar a cabo usando cebadores de ancla que dan origen a colgaduras complementarias entre dos fragmentos de genes consecutivos que se pueden recocer subsecuentemente y reamplificar para generar una secuencia de genes quiméricos (véase, *por ejemplo*, Ausubel *y colaboradores* (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Por otra parte, muchos vectores de expresión son comercialmente disponibles ya que codifican una porción de fusión (*por ejemplo*, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica FVII se puede clonar dentro de este vector de expresión, tal que la porción de fusión se enlaza dentro del marco a la proteína de proteasa.

4. Modificación del Polipéptido

Los polipéptidos FVII modificados se pueden preparar como

284

000254

cadenas de polipéptido desnudo o como un complejo. Para algunas aplicaciones, puede ser deseable preparar FVII modificado en una forma "desnuda" sin modificaciones post-traduccionales u otras modificaciones químicas. Las cadenas de polipéptido desnudo se pueden preparar en hospederos adecuados que no modifican post-traduccionalmente FVII. Estos polipéptidos también se pueden preparar en sistemas *in vitro* y usando síntesis química de polipéptido. Para otras aplicaciones, se pueden desear modificaciones particulares, que incluyen pegilación, albuminación, glicosilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, u otras modificaciones conocidas. Las modificaciones se pueden hacer *in vitro* o, por ejemplo, al producir el FVII modificado en un hospedero adecuado que produzca estas modificaciones.

5. Secuencias de Nucleótidos

Las moléculas de ácido nucleico que codifican FVII o polipéptidos FVII modificados se proporcionan en este documento. Las moléculas de ácido nucleico incluyen variantes alélicas o variantes de empalme de cualquier polipéptido FVII codificado. Ejemplares de moléculas de ácido nucleico proporcionada en este documento son cualquiera que codifique un polipéptido FVII modificado proporcionado en este documento, tal como cualquiera que codifique un polipéptido expuesto en cualquiera de SEQ ID No.: 113-273. En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en este documento tienen por lo menos 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, o 99% identidad de secuencia o se hibridan bajo condiciones de rigor medio o alto a lo largo de por lo menos

285

000255

70% de la longitud completa de cualquier ácido nucleico que codifique un polipéptido FVII proporcionado en este documento. En otra modalidad, una molécula de ácido nucleico puede incluir aquellas secuencias de codón degenerado que codifican cualquiera de los polipéptidos FVII proporcionados en este documento.

F. Estimación de las actividades del polipéptido FVII modificado

Las actividades y propiedades de los polipéptidos FVII se pueden estimar *in vitro* y/o *in vivo*. Ensayos para estas estimaciones son conocidos por aquellas personas expertas en el campo y son conocidos por correlacionar actividades sometidas a prueba y resultados a las actividades terapéuticas e *in vivo*. En un ejemplo, las variantes FVII se pueden estimar en comparación con el FVII no modificado y/o de tipo silvestre. En otro ejemplo, la actividad de los polipéptidos FVII modificados se puede estimar después de la estimación *in vitro* o *in vivo* a AT-III y se comparan con aquellos de los polipéptidos FVII modificados que no se han expuesto a AT-III. Estos ensayos se pueden realizar en presencia o ausencia de TF. Los ensayos *in vitro* incluyen cualquier ensayo de laboratorio conocido para una persona de experiencia en el campo, tal como por ejemplo, ensayos basados en células, que incluyen ensayos de coagulación, ensayos de enlace, ensayos de proteínas, y ensayos de biología molecular. Los ensayos *in vivo* incluyen ensayos de FVII en modelos animales, así como también la administración a humanos. En algunos casos, la actividad de FVII *in vivo* se puede determinar al estimar la sangre, suero, u otro fluido

000256

corporal para determinantes de ensayo. Las variantes FVII también se pueden someter a prueba *in vivo* para estimar una actividad o propiedad, tal como un efecto terapéutico.

Típicamente, los ensayos descritos en este documento están con respecto a la forma actividad de las cadenas de FVII, es decir, FVIIa. Estos ensayos también se realizan con la forma de cadena individual, tal como para proporcionar un control negativo puesto que esta forma no contiene típicamente actividad proteolítica o catalítica para la actividad coagulante de FVII. Además, estos ensayos también se pueden realizar en presencia de co-factores, tal como TF, los cuales en algunos casos aumentan la actividad de FVII.

1. Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* ejemplares incluyen ensayos para estimar la modificación y actividad del polipéptido. Las modificaciones se pueden estimar usando ensayos *in vitro* que estima la γ-carboxilación y otras modificaciones post-traduccionales, ensayos de proteínas y ensayos conformacionales conocidos en el campo. Los ensayos para la actividad incluyen, pero no se limitan a, medición de la interacción de FVII con otros factores de coagulación, tal como TF, factor X y factor IX, ensayos proteolíticos para determinar la actividad proteolítica de los polipéptidos FVII, ensayos para determinar el enlace y/o afinidad de los polipéptido FVII para las fosfatidilserinas y otros fosfolípidos, y ensayos basados en células para determinar el efecto de los polipéptidos FVII en la coagulación.

287

000257

Las concentraciones de polipéptidos FVII modificados se pueden estimar mediante métodos bien conocidos en el campo, que incluyen pero no se limitan a, ensayos inmunoabsorbentes enlazados a enzimas (ELISA), SDS-PAGE; métodos Bradford, Lowry, BCA; absorbencia de UV, y otros métodos de etiquetación de proteínas cuantificables, tal como, pero no se limita a, métodos inmunológicos, radioactivos y fluorescentes y métodos relacionados.

La estimación de los productos de escisión de las reacciones de proteólisis, que incluyen escisión de los polipéptidos FVII o productos producidos por la actividad de la proteasa FVII, se puede realizar usando métodos que incluyen, pero no se limitan a, escisión de sustrato cromogénico, HPLC, análisis SDS-PAGE, ELISA, técnica de Western Blot, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, secuenciación de NH2-terminal, y etiquetación de proteínas.

Las propiedades estructurales de los polipéptidos FVII modificados también se pueden estimar. Por ejemplo, la cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (NMR), y microscopía de crioelectrones (crio-EM) de los polipéptidos FVII modificados se puede realizar para estimar la estructura tridimensional de la polipéptidos FVII y/u otras propiedades de los polipéptidos FVII, tal como el enlace de Ca^{2+} o de cofactor.

Adicionalmente, la presencia y grado de degradación de FVII se puede medir mediante técnicas estándares tal como la electroforesis de gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), y la técnica de Western Blot de las muestras que contienen FVII electroforisado. Los polipéptidos FVII que

000258

se han expuesto a las proteasas también se pueden someter a la secuenciación N-terminal para determinar la ubicación o cambios en los sitios de escisión de los polipéptidos FVII modificados.

a. Modificación postraduccional

Los polipéptidos FVII también se pueden estimar para la presencia de modificaciones postraduccionales. Estos ensayos son conocidos en el campo e incluyen ensayos para medir la glicosilación, hidroxilación y carboxilación. En un ensayo ejemplar para la glicosilación, se puede realizar el análisis de carbohidratos, por ejemplo, con el análisis SDS-page de los polipéptidos FVII expuestos a la hidrazinolisis o tratamiento con endoglicosidasa. La hidrazinolisis libera glicanos N- y O-enlazados de glicoproteínas mediante la incubación con hidracina anhidra, mientras que la endoglicosidasa libera PNGasa F, la cual libera la mayoría de N-glicanos de glicoproteínas. La hidrazinolisis o el tratamiento con endoglicosidasa de los polipéptidos FVII generan un término de reducción que se puede etiquetar con una etiqueta de fluoróforo o cromóforo. Los polipéptidos FVII etiquetados se pueden analizar mediante la electroforesis de carbohidratos asistida con fluoróforo (FACE). La etiqueta fluorescente para los glicanos también se puede usar para el análisis de monosacáridos, perfil o huella de los patrones de glicosilación complejos por HPLC. Los métodos de HPLC ejemplares incluyen la cromatografía de interacción hidrofílica, interacción electrónica, intercambio iónico, interacción hidrofóbica y cromatografía de exclusión de tamaño. Las sondas de glicano ejemplares incluyen, pero no se limitan a, 3-(acetilamino)-6-

000259

aminoacridina (AA-Ac) y ácido 2-aminobenzoico (2-AA). Las porciones de carbohidratos también se pueden detectar del uso de anticuerpos específicos que reconocen el polipéptido FVII glicosilado. Un ensayo ejemplar para medir la β-hidroxilación comprende el análisis de HPLC de fase inversa de los polipéptidos FVII que se han sometido a la hidrólisis alcalina (Przysiecki *y colaboradores* (1987) PNAS 84:7856-7860). La carboxilación y γ-carboxilación de los polipéptidos FVII se puede estimar usando la espectrometría de masas con el análisis de tiempo de vuelo de ionización de desabsorción láser asistida con matriz (MALDI-TOF), como se describe en el campo (*véase, por ejemplo* Harvey *y colaboradores* J Biol Chem 278:8363-8369, Maun *y colaboradores* Prot Sci 14:1171-01180). La interacción de un polipéptido FVII que contiene el propéptido (pro-FVII) con la carboxilasa responsable por la modificación del γ-carboxilato postraduccional también se puede estimar. La constante de disociación (K_d) después de la incubación de la carboxilasa con los polipéptidos pro-FVII etiquetadas con fluoresceína se pueden medir al determinar la cantidad de carboxilasa en lazada mediante anisotropía (Lin *y colaboradores* (2004) J Biol Chem 279:6560-6566).

b. Actividad proteolítica

Los polipéptidos FVII modificados se pueden someter a prueba para la actividad proteolítica. La actividad proteolítica de FVII se puede medir usando substratos cromogénicos tales como Cromozima t-PA ($MeSO_2$-D-Phe-Gly-Arg-pNA), S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA), S-2266 (H-D- Val-Leu-Arg-

000260

pNA), S-2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), Espectrozima FXa y Espectrozima FVIIa (CH_3 SO_2-D-CHA-But-Arg-pNA). Los polipéptidos FVII solos o en presencia de TF, se incuban con concentraciones variantes de substrato cromogénico. La escisión del substrato se puede supervisar mediante la absorbancia de la velocidad de la hidrólisis del substrato determinada por la regresión lineal usando un software fácilmente disponible.

La activación de los substratos del factor de coagulación, tal como FX, por los polipéptidos FVII también se puede estimar. Los polipéptido FVII, con o sin pre-incubación con TF, se pueden incubar con FX purificado (comercialmente disponible). La cantidad de FXa activo producido como una consecuencia de incubación con los polipéptido FVII se mide como la actividad de FXa para un substrato cromogénico, tal como S-2222 o Espectrafluoro FXa (CH_3SO_2-D-CHA-Gly-ATg-AMC.AcOH), el cual se supervisa por la vía de cambios de absorbancia (Harvey *y colaboradores* J Biol Chem 278:8363-8369, véase también el Ejemplo 4 posteriormente). Una fuente de fosfolípido también se puede incluir en la incubación de FVII y FX (Nelsestuen *y colaboradores* (2001) J Biol Chem 276:39825-31).

c. Actividad de coagulación

Los polipéptidos FVII se pueden someter a prueba para la actividad de coagulación al usar ensayos bien conocidos en el campo. Por ejemplo, algunos de los ensayos incluyen, pero no se limitan a, un ensayo de coagulación de dos etapas (Liebman etai, (1985) PNAS 82:3879-3883); el ensayo de tiempo de protrombina (PT, el cual puede medir la actividad dependiente

00020

de TF de FVIIa en la vía extrínseca); ensayos los cuales son modificaciones de la prueba PT; el tiempo de la tromboplastina parcial activada (aPTT, el cual puede medir la actividad independiente de TF de FVIIa); tiempo de coagulación activada (ACT); tiempo de coagulación activada recalcificada; el tiempo de coagulación Lee-White; o tromboelastografía (TEG) (Pusateri *y colaboradores* (2005) Critical Care 9:S15-S24). Por ejemplo, la actividad de coagulación de un polipéptido FVII modificado se puede determinar por un ensayo basado en PT donde FVII se diluye en plasma deficiente de FVII, y se mezcla con un reactivo de tiempo de protrombina (TF recombinante con fosfolípidos y calcio), tal como aquel disponible como Innovin^{MR} de Dade Behring. La formación de coágulos se detecta ópticamente y el tiempo de la formación de coágulo se determina y se compara contra el plasma deficiente de FVII solo.

d. Enlace a y/o inhibición por otras proteínas y moléculas

Los ensayos de inhibición se pueden usar para medir la resistencia de los polipéptidos FVII modificados a los inhibidores FVII, tal como, por ejemplo, AT-III y TFPI, o moléculas tal como Zn^{2+}. La estimación de la inhibición a otros inhibidores también se puede someter a prueba e incluyen, pero no se limitan a, otros inhibidores de serina-proteasa, y anticuerpos de FVII. La inhibición se puede estimar mediante la incubación de, por ejemplo, AT-III, TFPI o Zn^{2+} con polipéptidos FVII que se han pre-incubado con y/o sin TF. La actividad de FVII luego se puede medir usando cualquiera de uno o más de los

000062

ensayos de actividad o coagulación descritos anteriormente, y la inhibición por AT-III, TFPI, o Zn^{2+} se puede estimar al comparar la actividad de los polipéptidos FVII incubados con el inhibidor, con la actividad de los polipéptidos FVII que no se incubaron con el inhibidor.

Los polipéptidos FVII se pueden someter a prueba para enlazarse a otros factores de coagulación e inhibidores. Por ejemplo, las interacciones directas e indirectas de FVII con cofactores, tales como TF, sustratos, tal como FX y FIX, e inhibidores, tal como la antitrombina III, TFPI, y heparina se pueden estimar usando cualquier ensayo de enlace conocido en el campo, que incluyen, pero no se limitan a, inmunoprecipitación, purificación en columna, SDS-PAGE no de reducción, ensayos BIAcore^{MR}, resonancia de plasmones superficiales (SPR), transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), polarización de fluorescencia (FP), calorimetría de titulación isotérmica (ITC), dicroísmo circular (CD), ensayos de complementación de fragmentos de proteína (PCA), espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR), dispersión de luz, equilibrio de sedimentación, cromatografía de filtración en gel de zona pequeña, retardación de gel, técnica de Far-western blotting, polarización de fluorescencia, huella de proteína radical de hidroxilo, expresión en fago, y varios sistemas de dos híbridos. En un ejemplo, el enlace de Zn^{2+} se estima usando el análisis de equilibrio (Petersen *y colaboradores*, (2000) Protein Science 9:859-866).

e. Afinidad del fosfolípido

El enlace y/o afinidad del polipéptido FVII modificado

293

000263

para la fosfatidilserina (PS) y otros fosfolípidos se puede determinar usando ensayos bien conocidos en el campo. Los fosfolípidos altamente puros (por ejemplo, concentraciones conocidas de PS de bovino y fosfatidilcolina (PC) de huevo, los cuales son comercialmente disponibles, tal como de Sigma, en solvente orgánico se pueden usar para preparar vesículas de fosfolípidos unilamelares pequeñas. El polipéptido FVII que se enlaza a estas vesículas PS/PC se puede determinar mediante la dispersión de luz relativa a 90° a la luz incidente. La intensidad de la dispersión de luz con PC/PS solo y con PC/PS/FVII se mide para determinar la constante de disociación (Harvey *y colaboradores* J Biol Chem 278:8363-8369). La resonancia de plasma superficial, tal como sobre un instrumento biosensor BIAcore^{MR}, también se puede usar para medir la afinidad de los polipéptidos FVII para las membranas de fosfolípidos (Sun *y colaboradores* Blood 101:2277-2284).

2. Modelos animales no humanos

Los modelos animales no humanos se pueden usar para estimar la actividad, eficacia y seguridad de los polipéptidos FVII modificados. Por ejemplo, los animales no humanos se pueden usar como modelos para una enfermedad o condición. Los animales no humanos se pueden inyectar con la enfermedad y/o sustancias que inducen el fenotipo antes de la administración de las variantes de FVII, tal como cualquier variante de FVII expuesta en cualquiera de SEQ ID NOS: 113-273, para supervisar los efectos en la progresión de la enfermedad. Los modelos genéticos también son útiles. Se pueden generar animales, tal como ratones, los cuales imitan una enfermedad o condición

294

000264

mediante la sobreexpresión, bajo expresión o deficiencia genética de uno o más genes, tales como, por ejemplo, ratones genéticamente deficientes de factor VIII que exhiben hemofilia A (Bi *y colaboradores* (1995) Nat .Gen 10:119-121). Estos animales se pueden generar mediante técnicas de producción de animales transgénicos bien conocida en el campo o usando cepas mutantes de origen natural o inducidas. Ejemplos de modelos animales no humano útiles de enfermedades asociadas con FVII incluyen, pero no se limitan a, modelos de trastornos de sangrado, en particular hemofilia, o enfermedad trombótica. Los modelos animales no humano para lesión también se pueden usar para estimar una actividad, tal como la actividad de coagulación, de los polipéptidos FVII. Estos modelos animales no humanos se pueden usar para supervisar la actividad de las variantes de FVII comparadas con un polipéptido FVII de tipo silvestre.

Los modelos animales también se pueden usar para monitorear la estabilidad, vida media y eliminación de los polipéptidos FVII modificados. Estos ensayos son útiles para comparar los polipéptidos FVII modificados y para calcular las dosis y regímenes de dosis para ensayos adicionales de animales no humanos y humanos. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado, tal como cualquier variante de FVII proporcionado en este documento incluye, por ejemplo, cualquiera expuesta en cualquiera de SEQ ID NOS: 113-273, se puede inyectar en la vena de la cola de los ratones. Las muestras de sangre luego se toman en puntos de tiempo después de la inyección (tal como minutos, horas y días posteriormente) y luego el nivel de los

295

000265

polipéptidos FVII modificados en las muestras corporales que incluyen, pero no se limitan a, suero o plasma, se pueden supervisar en puntos de tiempo específicos por ejemplo mediante el ELISA o radioinmunoensayo. Las muestras de sangre de varios puntos de tiempo después de la inyección de los polipéptidos FVII también se someten a prueba para la actividad de coagulación usando varios métodos, tal como se describe en el Ejemplo 9. Estos tipos de estudios farmacocinéticos pueden proporcionar información con respecto a la vida media, eliminación y estabilidad de los polipéptidos FVII, los cuales pueden ayudar a determinar las dosis adecuadas para la administración como un procoagulante.

Los polipéptidos FVII modificados, tal como cualquiera que se exponga en cualquiera de SEQ ID NOS: 113-273, se puede someter a prueba para la efectividad terapéutica usando modelos animales para la hemofilia, en un ejemplo no limitante, un modelo animal tal como un ratón se puede usar. Los modelos de ratón de la hemofilia están disponibles en el campo y se pueden emplear para someter a prueba los polipéptidos FVII modificados. Por ejemplo, un modelo de ratón de hemofilia A que se produce mediante la inyección con anticuerpos anti-FVIII se puede usar para estimar la actividad coagulante de los polipéptidos FVII (véase por ejemplo el Ejemplo 6, y Tranholm *y colaboradores* Blood (2003)102:3615-3620). Un modelo de ratón de hemofilia B también se puede usar para someter a prueba los polipéptidos FVII (Margaritis *y colaboradores* (2004) J Clin Invest 113:1025-1031). Los modelos no de ratón de trastornos de sangrado también existente. La actividad del polipéptido FVII

296

se puede estimar en ratas con hemorragia inducida por warfarina o hemorragia inducida por melagatran (Diness *y colaboradores* (1992) Thromb Res 67:233-241, Elg *y colaboradores* (2001) Thromb Res 101:145-157), y conejos con hemorragia inducida con heparina (Chan *y colaboradores* (2003) J Thromb Haemost 1:760-765). Perros con enfermedad de hemofilia A, hemofilia B y von Willebrand congénita que exhiben hemorragia grave también se pueden usar en estudios de animal no humano con polipéptidos FVII (Brinkhous *y colaboradores* (1989) PNAS 86:1382-1386). La actividad de los polipéptidos FVII también se puede estimar en un modelo de conejo de hemorragia en el cual la trombocitopenias se induce mediante una combinación de irradiación de rayos gamma y el uso de anticuerpos de plaqueta (Tranholm *y colaboradores* (2003) Thromb Res 109:217-223).

Además de los animales con trastornos de sangrado generalizados, modelos de lesión y trauma también se pueden usar para evaluar la actividad de los polipéptidos FVII, y su seguridad y eficacia como un agente terapéutico coagulante. Ejemplos no limitantes de estos modelos incluyen un modelo de estenosis con área de conejo (Fatorutto *y colaboradores* (2004) Can J Anaesth 51:672-679), un modelo de lesión del hígado grado V en cerdos (Lynn *y colaboradores* (2002) J Trauma 52:703-707), un modelo de lesión de hígado grado V en cerdos (Martinowitz *y colaboradores* (2001) J Trauma 50:721-729) y un modelo de aortotomía de cerdo (Sondeen *y colaboradores* (2004) Shock 22:163-168).

3. Ensayos clínicos

Muchos ensayos están disponibles para estimar la actividad

297

de FVII para el uso clínico. Estos ensayos pueden incluir la estimación de la coagulación, estabilidad de proteínas y vida media *in vivo*, y ensayos fenotípicos. Los ensayos fenotípicos y los ensayos para estimar el efecto terapéutico del tratamiento con FVII incluyen la estimación de los niveles de sangre de FVII (por ejemplo medición del FVII en suero antes de la administración y puntos de tiempo después de las administraciones que incluyen, después de la primera administración, inmediatamente después de la última administración, y puntos de tiempo intermedios, corrección para el índice de masa corporal (BMI)), estimación de la coagulación de la sangre *in vitro* usando los métodos descritos anteriormente después del tratamiento con FVII (por ejemplo, ensayo PT), y respuesta fenotípica al tratamiento con FVII que incluye mejoramiento de los síntomas a través del tiempo comparados con los sujetos tratados con un FVII no modificado y/o de tipo silvestre o placebo. Los pacientes tratados con polipéptidos FVII se pueden supervisar para la pérdida de sangre, requerimiento de transfusión, y hemoglobina. Los pacientes se pueden supervisar regularmente durante un período de tiempo para administraciones de rutina o repetidas, o después de la administración en respuesta a eventos agudos tales como hemorragia, trauma o procedimientos quirúrgicos.

G. Formulación y Administración

Las composiciones para el uso en el tratamiento de trastornos de sangrado se proporcionan en este documento. Estas composiciones contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de factor VII como se describe en este

000269

documento. Las concentraciones efectivas de los polipéptidos FVII o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se mezclan con un portador o vehículo farmacéutico aceptable para la administración sistémica, tópica o local. Los compuestos se incluyen se incluyen en una cantidad efectiva para tratar el trastorno seleccionado. La concentración del compuesto activo en la composición dependerá en la absorción, inactivación, velocidades de excreción del compuesto activo, el programa de dosificación, y la cantidad administrada así como también otros factores conocidos por aquellas personas expertas en el campo.

Los portadores o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos proporcionados en este documento incluyen cualquiera de estos portadores conocidos por aquellas personas expertas en el campo que sean adecuados para el modo particular de administración. Las composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido FVII descrito en este documento también se puede proporcionar como un polvo liofilizado que se reconstituye, tal como con agua estéril, inmediatamente antes de la administración.

1. Formulaciones

Las composiciones farmacéuticas que contienen un FVII modificado se pueden formular de cualquier manera convencional al mezclar una cantidad seleccionada del polipéptido con uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. La selección del portador o excipiente está dentro de la experiencia de la profesión de administración y puede depender de una variedad de parámetros. Estos incluyen, por ejemplo, el

modo de administración (es decir sistémico, oral, nasal, pulmonar, local, tópico, o cualquier otro modo) y trastorno tratado. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento se pueden formular para una sola administración de dosificación (directa) o para la dilución u otra modificación. Las concentraciones de los compuestos en las formulaciones son efectivas para el suministro de una cantidad, en la administración, que es efectiva para el tratamiento propuesto. Típicamente, las composiciones se formulan para una sola administración de dosificación. Para formular una composición, la fracción en peso de un compuesto o mezcla del mismo se disuelve, se suspende, se dispersa, o de otra manera se mezcla en un vehículo seleccionado a una concentración efectiva tal que la condición tratada se alivia o se mejora.

Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden formular para administración a un sujeto como una proteína FVIIa de dos cadenas. Los polipéptidos FVII modificados se pueden activar mediante cualquier método conocido en el campo antes de la formulación. Por ejemplo, el FVII se puede someter a la autoactivación durante la purificación mediante la cromatografía de intercambio iónico (Jurlander *y colaboradores* (2001) Semin Thromb Hemost 27:373-384). Los polipéptidos FVII modificados también se pueden activar mediante la incubación con FXa inmovilizado sobre perlas (Kemball-Cook *y colaboradores* (1998) J Biol Chem 273:8516-8521), o cualquier otro de los métodos conocidos en el campo (véase también el Ejemplo 2 posteriormente). La inclusión de calcio en estos procesos asegura la activación total y el

300

plegamiento correcto de la proteína FVIIa modificada. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento también se pueden formular para la administración como una sola proteína de cadena. Los polipéptidos FVII de cadena individual se pueden purificar de tal manera como para prevenir la escisión (véase, por ejemplo, US6677440). Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden formular tal que las formas de cadena individual y dos cadenas están contenidas en la composición farmacéutica, en cualquier relación mediante la selección apropiada del medio para eliminar o controlar la autoactivación.

El compuesto se puede suspender en forma micronizada u otra forma adecuada o se puede derivar para producir un producto activo más soluble. La forma de la mezcla resultante depende de una variedad de factores, que incluyen el modo propuesto de administración y la solubilidad de compuesto en el portador o vehículo seleccionado. Las mezclas resultantes son soluciones, suspensiones, emulsiones y otras de estas mezclas, y se pueden formular como una mezcla no acuosa o acuosa, cremas, geles, ungüentos, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, rocíos, supositorios, vendajes, o cualquier otra formulación adecuada para la administración sistémica, tópica o local. Para la administración interna local, tal como, administración intramuscular, parenteral o intraarticular, los polipéptidos se pueden formular como una suspensión en solución en un medio basado acuso, tal como solución salina isotónicamente amortiguadas o se combinan con un soporte

biocompatible o bioadhesivo propuesto para la administración interna. La concentración efectiva es suficiente para mejorar la condición objetivo y se puede determinar empíricamente. Para formular una composición, la fracción en peso del compuesto se disuelve, se suspende, se dispersa, o de otra manera se mezcla en un vehículo seleccionado en una concentración efectiva 'tal que la condición objetiva se alivia o se mejora.

Generalmente, las composiciones farmacéuticamente aceptables se preparan en vista de aprobaciones por una agencia reguladora u otras preparadas de acuerdo con la farmacopea generalmente reconocida para el uso en animales y en humanos. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores tales como un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el cual se administra una isoforma. Estos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tal como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuate, aceite de soya, aceite mineral, y aceite de ajonjolí. El agua es un portador típico cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las soluciones salinas y las soluciones de dextrosa y glicerol acuosas también se pueden emplear como portadores líquidos, particularmente para las soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener junto con un ingrediente activo: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato de dicalcio, o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio, y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tal como goma de acacia, gelatina, glucosa, melazas, polivinilpirrolidona,

302

000272

celulosa y derivados de los mismos, povidona, crospovidonas y otros de estos aglutinantes conocidos para aquellas personas expertas en el campo. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propilenglicol, agua y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes de humectación o emulsionadores, o agentes amortiguadores de pH, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitan, acetato de sodio de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros de estos agentes. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, y formulaciones de liberación sostenida. Las cápsulas y cartuchos de por ejemplo, gelatina para el uso en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mezcla de polvo de un compuesto terapéutico y una base de polvo adecuado tal como lactosa o almidón. Una composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes adicionales y portadores tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándares tales como de grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, y otros de estos agentes. Las preparaciones para administración oral también se pueden formular adecuadamente con inhibidores de proteasa, tal como el inhibidor de Bowman-Birk, inhibidor de Bowman-Birk conjugado, aprotinina y camostato. Ejemplos de

303

portadores farmacéuticos adecuados se describe en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Estas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto, generalmente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para la administración apropiada a un sujeto o paciente.

La formulación se debe adaptar al modo de administración. Por ejemplo, el FVII modificado se puede formular para administración parenteral mediante inyección (por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua). Las composiciones inyectables pueden tomar estas formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,4-butanodiol. Aceites fijos, estériles se pueden emplear convencionalmente como un solvente o medio de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo blando se puede emplear, incluyendo, pero no se limita a, mono-diglicéridos sintéticos, ácidos grasos (que incluyen ácido oleico), aceites vegetales de origen natural como aceite de ajonjolí, aceite de coco, aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón, y otros aceites, o vehículos grasos sintéticos como oleato de etilo. Soluciones amortiguadoras, conservadores, antioxidantes, y los ingredientes adecuados, se pueden incorporar como se requiera, o, alternativamente, pueden comprender la formulación.

Los polipéptidos se pueden formular como el único

ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o se pueden combinar con otros ingredientes activos. Los polipéptidos se pueden dejar como objetivo para el suministro, tal como mediante la conjugación a un agente objetivo, tal como un anticuerpo. Las suspensiones liposomales, que incluyen liposomas fijadas como objetivo al tejido, también pueden ser adecuadas como portadoras farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por aquellas personas expertas en el campo. Por ejemplo, las formulaciones de liposomas se pueden preparar como se describe en la Patente de E.U.A. No. 4,522,811. El suministro liposomal también puede incluir formulaciones de liberación lenta, que incluyen matrices farmacéuticas tales como geles de colágeno y liposomas modificados con fibronectina (véase, por ejemplo, Weiner *y colaboradores* (1985) J Pharm Sci. 74(9):922-5). Las composiciones proporcionadas en este documento pueden contener además uno o más adyuvantes que facilitan el suministro, tal como, pero no se limitan a, portadores inertes, o sistemas de dispersión coloidales. Ejemplos representativos y no limitantes de estos portadores inertes se pueden seleccionar de agua, alcohol isopropílico, clorocarburos gaseosos, alcohol etílico, polivinilpirrolidona, propilenglicol, un material productor de gel, alcohol estearílico, ácido esteárico, esperma de ballena, monooleato de sorbitan, metilcelulosa, así como también, combinaciones adecuadas de dos o más de los mismos. El compuesto activo se incluye en el portador farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios

305

indeseables sobre el sujeto tratado. La concentración terapéuticamente efectiva se puede determinar empíricamente al someter a prueba los compuestos en sistemas *vitro* e *in vivo* conocidos, tales como los ensayos proporcionados en este documento.

a. Dosificaciones

La cantidad precisa o dosis del agente terapéutico administrado depende del polipéptido FVII particular, la vía de administración, y otras consideraciones, tal como la gravedad en la enfermedad y el peso y el estado general del sujeto. La administración local del agente terapéutico requerirá típicamente una dosis más pequeña que cualquier modo de administración sistémica, aunque la concentración del agente terapéutico puede, en algunos casos, ser más alto después de la administración local que se puede lograr con seguridad en la administración sistémica. Si es necesario, una dosificación particular y duración y protocolo del tratamiento se pueden determinar empíricamente o extrapolar. Por ejemplo, las dosis ejemplares de polipéptidos FVII recombinantes y nativos se pueden usar como un punto de partica para determinar dosificaciones apropiadas. Por ejemplo, un polipéptido FVII recombinante (rFVIIa) que ha activado a rFVIIa, NovoSeven^{MR}, se han administrado a pacientes con hemofilia A o hemofilia B, quienes están experimentando un episodio hemorrágico, en una dosificación de 90 µg/kg mediante la infusión de bolo durante 2 a 5 minutos, logrando un nivel de circulación efectivo de por lo menos 2 µg/ml. La dosis se repite cada 2 horas hasta que se logra la hemostasis. Los polipéptidos FVII modificados

306

000276

proporcionados en este documento pueden ser efectivos en cantidades y/o frecuencias de dosificación reducidas comparados con un FVII recombinante. Por ejemplo, en los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden administrar en una dosificación de 80 µg/kg, 70 µg/kg, 60 µg/kg, 50 µg/kg, 40 µg/kg, 30 µg/kg, 20 µg/kg, 15 µg/kg o menos. En algunas modalidades, las dosificaciones pueden ser más altas, tal como 100 µg/kg, 110 µg/kg, 120 µg/kg, o más altas. La duración del tratamiento y el intervalo entre las inyecciones variará con la gravedad del sangrado y la respuesta del paciente al tratamiento, y se puede ajustar por consiguiente. Los factores tales como el nivel de actividad y la vida media del FVII modificado en comparación en el FVII no modificado se pueden tomar en cuenta cuando se hacen las determinaciones de dosificación. Se pueden determinar empíricamente las dosificaciones y regímenes particulares.

En otro ejemplo, un polipéptido FVII recombinante (rFVIIa) que se ha activado a rFVIIa, NovoSeven^{MR}, se ha administrado a pacientes con deficiencia FVII congénita quienes están experimentando un episodio hemorrágico, en una dosificación de 15-30 µg/kg mediante la infusión de bolo durante 2 a 5 minutos. La dosis se repite cada 4-6 horas hasta que se logra la hemostasis. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento pueden ser efectivos en cantidades y/o frecuencia de dosificación reducidas comparadas con FVII recombinante. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden administrar en una dosificación de 20 µg/kg, 15 µg/kg, 10 µg/kg, 5 µg/kg, 3 µg/kg

307

o menos. En algunos ejemplos, las dosificaciones pueden ser más altas, tal como 35 µg/kg, 40 µg/kg, 45 µg/kg, o más altas. La duración del tratamiento y el intervalo entre las inyecciones variará con la gravedad del sangrado y la respuesta del paciente al tratamiento, y se puede ajustar por consiguiente. Los factores tales como el nivel de actividad y vida media del FVII modificado en comparación con el FVII no modificado se pueden usar en hacer las determinaciones de dosificación. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado que exhibe una vida media más prolongada que un polipéptido FVII no modificado se puede administrar en dosis más bajas y/o menos frecuentemente que un polipéptido FVII no modificado. Similarmente, las dosificaciones requeridas para el efecto terapéutico que usan un polipéptido FVII modificado que exhibe actividad coagulante incrementada comparado con un polipéptido FVII no modificado se pueden reducir en frecuencia y cantidad. Las dosificaciones y regímenes particulares se pueden determinar empíricamente por una persona experta en el campo.

b. Formas de dosificación

Los compuestos terapéuticamente activos farmacéuticos y derivados de los mismos se formulan y se administran típicamente en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiple. La formulación se puede proporcionar para la administración a humanos y animales en forma de dosificación que incluyen, pero no se limitan a, tabletas, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles, soluciones o suspensiones orales, y emulsiones de aceite-agua que contienen cantidades adecuadas de

000278

los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Ejemplos de formas de dosis unitaria incluyen ampolletas y jeringas y tabletas y cápsulas individualmente empaquetadas. En algunos ejemplos, la dosis unitaria se proporciona como un polvo liofilizado que es reconstituido antes de la administración. Por ejemplo, un polipéptido FVII se puede proporcionar como polvo liofilizado que se reconstituye con una solución adecuada para generar una solución de dosis individual para la inyección. En algunas modalidades, el polvo liofilizado puede contener el polipéptido FVII y componentes adicionales tales como sales, tal que la reconstitución con el agua destilada estéril da por resultado un polipéptido FVII en una solución amortiguada o salina. La forma de dosificación unitaria se pueden administrar en fracciones o múltiples de las mismas. Una forma de dosificación múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitaria idénticas y empaquetadas en un contenedor individual que se administra en forma de dosis unitaria agregada. Ejemplos de forma de dosificación múltiples incluyen frasquitos, botellas de tabletas o cápsulas, o botellas de tintas o galones. Por consiguiente, la forma de dosificación múltiple es un múltiple de dosis unitaria que no se segregan en el empaque.

2. Administración de los polipéptidos FVII modificados

Los polipéptidos FVII proporcionados en este documento (es

000279

decir compuestos activos) se pueden administrar *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo* al poner en contacto una mezcla, tal como un fluido corporal u otras muestras de tejido, con un polipéptido FVII. Por ejemplo, cuando se administra un compuesto *ex vivo*, un fluido corporal o muestra de tejido de un sujeto se puede poner en contacto con los polipéptidos FVII que se recubren sobre un tubo o filtro, tal como por ejemplo, un tubo o filtro en una máquina de derivación. Cuando se administra *in vivo*, los compuestos activos se pueden administrar mediante cualquier vía apropiada, por ejemplo, oral, nasal, pulmonar, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraarticular, intracisternal, intraocular, intraventricular, intratecal, intramuscular, intraperitoneal, intratraqueal o tópicamente, así como también mediante cualquier combinación de cualquiera de dos o más de los mismos, en forma líquida, semilíquida o sólida y se formulan en una manera adecuada para cada vía de administración. Los polipéptidos FVII modificados se pueden administrar una vez o más de una vez, tal como dos veces, tres veces, cuatro veces, o cualquier variedad de veces que sean requeridas para lograr un efecto terapéutico. Las administraciones múltiples se pueden efectuar por medio de cualquier vía o combinación de vías, y se pueden administrar cada hora, cada dos horas, cada tres horas, cada cuatro horas o más.

La vía más adecuada de administración variará dependiendo de estado de enfermedad que se trata, por ejemplo la ubicación del trastorno hemorrágico. Generalmente, los polipéptidos FVII se administrarán mediante inyección de bolo intravenosa, con un

tiempo de administración (infusión) de aproximadamente 2-5 minutos. En otros ejemplos, los niveles de sangre deseables de FVII se pueden mantener mediante una infusión continua del agente activo como es estimado por los niveles de plasma. Se debe observar que el médico que atiende sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir y ajustar la terapia a una dosificación más baja debido a la toxicidad, o disfunciones de la médula ósea, hígado o riñones. A la inversa, el médico que atiende también sabrá cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica es adecuada (previniendo efectos secundarios tóxicos). En otros ejemplos, la ubicación del trastorno hemorrágico podría indicar que la formulación FVII se administra por medio de vías alternativas. Por ejemplo, la administración local, que incluye la administración dentro del cerebro (por ejemplo, intraventricularmente) mes podría registrar cuando el paciente está experimentando hemorragia en esta región. Similarmente, para al tratamiento de hemorragia en las articulaciones, la administración local mediante la inyección del agente terapéutico dentro de la articulación (es decir, intra-articularmente, medios intravenosos o subcutáneos) se puede emplear. En otros ejemplos, la administración tópica del agente terapéutico a la piel, por ejemplo formulada como una crema, gel, o ungüento, o administración a los pulmones mediante la inhalación o intra-traquealmente, podrían ser apropiadas cuando la hemorragia se localiza en estas áreas.

Los casos donde los polipéptidos FVII modificados van a ser formulados como una preparación de depósito, las formulaciones de acción prolongada se pueden administrar

mediante la implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. De esta manera, por ejemplo, los compuestos terapéuticos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo como una emulsión o un aceite aceptable) o resina de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

Las composiciones, si se desea se pueden presentar en un paquete, en un kit o dispositivo dispensador, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El paquete, por ejemplo, contiene láminas delgadas de metal o plástico, tal como un paquete de ampolla. El paquete o el dispositivo dispensador se pueden acompañar por instrucciones para la administración. Las composiciones que contienen los agentes activos es pueden empaquetar como artículos de manufactura que contienen el material de empaque, un agente proporcionado en este documento, y una etiqueta que indica el trastorno por el cual el agente se proporciona.

3. Administración de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos FVII modificados (terapia génica)

También se proporcionan composiciones de moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos FVII modificados y los vectores de expresión que los codifican que son adecuados para la terapia génica. Antes del suministro de la proteína, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo*, tal como sistémicamente o mediante otra vía, o *ex vivo*, tal como mediante la remoción de células, que incluyen linfocitos,

312

introducción del nucleico en el mismo, e introducción dentro del hospedero y un recipiente compatible.

Se pueden suministrar polipéptidos FVII modificados a las células y tejidos mediante la expresión de moléculas de ácido nucleico. Los polipéptidos FVII modificados se pueden administrar como moléculas de ácido nucleico ácido nucleico que codifican polipéptidos FVII modificados, que incluyen técnicas *ex vivo* y expresión *in vivo* directa. Los ácidos nucleicos se pueden suministrar a las células y tejidos mediante cualquier método conocido por aquellas personas expertas en el campo. Las secuencias de ácidos nucleicos aisladas se pueden incorporar en los vectores para manipulación adicional. Como se usa en este documento, vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se usan para introducir ADN heterólogo dentro de las células para ya sea la expresión o replicación del mismo. La selección y uso de estos vehículos están muy adentro de la experiencia del artífice.

Los métodos para administrar los polipéptidos FVII modificados mediante la expresión de la codificación de las moléculas de ácido nucleico incluyen la administración de vectores recombinantes. El vector se puede diseñar para permanecer episomal, tal como mediante la infusión de un origen de replicación o se pueden diseñar para integrarse dentro de un cromosoma en la célula. Polipéptidos FVII modificados también se pueden usar en la terapia de expresión génica *ex vivo* usando vectores no virales. Por ejemplo, las células se pueden diseñar para expresar un polipéptido FVII modificado, tal como al integrar un ácido nucleico que codifica el polipéptido FVII

313

modificado dentro de una ubicación genómica, ya sea enlazado operativamente a la secuencia reguladoras o tal que se coloca enlazado operativamente a las secuencias reguladoras en una ubicación genómica. Estas células luego se pueden administrar local o sistémicamente a un sujeto, tal como un paciente en necesidad de tratamiento.

Los vectores virales, incluyen, por ejemplo adenovirus, virus asociados con adeno (AAV), poxvirus, virus del herpes, retrovirus y otros designados para la terapia génica se pueden emplear. Los vectores pueden permanecer episomales o pueden integrarse dentro de los cromosomas del sujeto tratado. Un polipéptido FVII modificado se puede expresar por un virus, el cual se administra a un sujeto en necesidad de tratamiento. Vectores virales adecuados para la terapia génica incluyen adenovirus, virus asociados con adeno (AAV), retrovirus, lentivirus, virus de vaccinia y otros observados anteriormente. Por ejemplo, la tecnología de expresión del adenovirus es bien conocida en el campo y los métodos de producción y administración del adenovirus también son bien conocidos. Los serotipos de adenovirus están disponibles, por ejemplo, de the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Los adenovirus se pueden usar *ex vivo*, por ejemplo, las células se aíslan de un paciente en necesidad de tratamiento, y se transducen con un vector de adenovirus que expresa el polipéptido FVII modificado. Después de un período de cultivo adecuado, las células transducidas se administran a un sujeto, local y/o sistémicamente. Alternativamente, las partículas de adenovirus que expresan el polipéptido FVII modificado se

000284

aíslan y se formulan en un portador farmacéuticamente aceptable para el suministro de una cantidad terapéuticamente efectiva para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad o condición de un sujeto. Típicamente, las partículas de adenovirus se suministran en una dosis que varía de 1 partícula 10^{14} partículas por kilogramo del peso de sujeto, generalmente entre 10^{6} o 10^{8} partículas a 10^{12} partículas por kilogramo del peso del sujeto. En algunas situaciones es deseable proporcionar una fuente de ácidos nucleicos con un agente que fija como objetivo las células, tal como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie celular o una célula objetivo, o un ligando para un receptor sobre una célula objetivo. El FVII también se puede fijar como objetivo para el suministro dentro de los tipos de células específicas. Por ejemplo, los vectores adenovirales que codifican los polipéptidos FVII se pueden usar para la expresión estable en las células no de dilución, tal como las células del hígado (Margaritis *y colaboradores* (2004) J Clin Invest 1 13:1025-1031). En otro ejemplo, los vectores virales o no virales que codifican los polipéptidos FVII se pueden transducir dentro de las células aisladas para el suministro subsecuente. Tipos de célula adicionales para la expresión y suministro de FVII podrían incluir, pero no se limitan a, fibroblastos y células endoteliales.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden introducir dentro de los cromosomas artificiales y otros vectores no virales. Los cromosomas artificiales, tales como ACES (véase, Lindenbaum *y colaboradores* (2004) Nucleic Acids Res.

315

32(21):e172) se pueden diseñar para codificar y expresar la isoforma. Brevemente, los cromosomas artificiales de mamífero (MACs) proporcionan un medio para introducir grandes cargas útiles de información genética dentro de la célula en un formato no integrante, autónomamente de replicación. Únicos entre los MACs, la Expresión del Cromosoma Artificial (ACE) basada en ADN satélite de mamífero se puede generar reproduciblemente de nuevo en líneas de células de diferentes especies y purificar fácilmente de los cromosomas de las células hospederas. Las ACEs de mamífero purificadas luego se pueden reintroducir en una variedad de líneas de células recipientes donde se han mantenido establemente durante períodos prolongados en ausencia de la presión selectiva usando un sistema ACE. Usando este procedimiento, la carga específica de uno o dos objetivos técnicos se ha logrado en las células LMTK(-) y CHO.

Otro método para introducir ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos FVII modificados es una técnica de reemplazo de genes de dos etapas en la levadura, comenzando con un genoma de adenovirus completo (Ad2; Ketner *y colaboradores* (1994) PNAS 91:6186-6190) clonado en un Cromosoma Artificial de Levadura (YAC) y unas secuencias de adenovirus que contienen plásmido para fijar como objetivo una región específica en el clon YAC, un casete de expresión para el gen de interés y un marcador seleccionable positivo y negativo. Los YACs son de interés particular debido a que permiten la incorporación de genes más grandes. Este procedimiento se puede usar para la construcción de vectores basados en adenovirus que llevan ácidos nucleicos

316

que codifican cualquiera de los polipéptidos FVII modificados descritos para la transferencia de genes a células de mamífero o animales enteros.

Los ácidos nucleicos se pueden encapsular en un vehículo, tal como un liposoma, o introducir en unas células, tal como célula bacteriana, particularmente una bacteria atenuada o introducida en un vector viral. Por ejemplo, cuando los liposomas se emplean, las proteínas que se enlazan a una proteína de la membrana de superficie celular con endocitosis se puede usar para fijar como objetivo y/o para facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas las cuales se someten a la internalización en la ciclación, y proteínas que fijan como objetivo la localización intracelular y mejoran la vida media intracelular.

Para los métodos *ex vivo* e *in vivo*, las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido FVII modificado se introducen en las células que son de un donador adecuado o el sujeto que se trata. Las células dentro de las cuales un ácido nucleico se puede introducir para propósitos de terapia incluyen, por ejemplo, cualquier tipo de célula disponible, deseado apropiado para la enfermedad o condición que se trata, incluyendo pero no se limita a células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como T linfocitos, B linfocitos, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; varias células madre o

317

progenitoras en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, tales como células madre obtenidas de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal y otras fuentes de las mismas.

Para el tratamiento *ex vivo*, las células de un donador compatible con el sujeto que se trata y las células se remueven, el ácido nucleico se introduce dentro de estas células aisladas y las células modificadas se administran al sujeto. El tratamiento incluye la administración directa, tal como, por ejemplo, encapsulada dentro de membranas porosas, las cuales se implantan dentro del paciente (véase, por ejemplo, Patentes de E.U.A. Nos. 4,892,538 y 5,283,187 cada una de la cual se incorpora en este documento a manera de referencia en su totalidad). Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico dentro de las células de mamífero *in vivo* incluyen el uso de liposomas y lípidos catiónicos (*por ejemplo*, DOTMA, DOPE y DC-Chol) electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, y métodos de precipitación de fosfato de calcio. Los métodos de suministro de DNA se pueden usar para expresar polipéptidos FVII modificados *in vivo*. Estos métodos incluyen el suministro de liposomas de ácidos nucleicos y suministro de ADN desnudo, que incluye suministro local y sistémico tal como el uso de electroporación, ultrasonido y suministro de fosfato de calcio. Otras técnicas incluyen microinyección, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas y fusión de esferoplasto.

La expresión *in vivo* de un polipéptido FVII modificado se

000288

puede enlazar a la expresión de moléculas adicionales. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido FVII modificado se puede enlazar con la expresión de un producto citotóxico tal como en un virus diseñado o expresado en un virus citotóxico. Estos virus se pueden dejar como objetivo a un tipo de célula particular que es un objetivo para un efecto terapéutico. El polipéptido FVII modificado expresado se puede usar para mejorar la citotoxicidad del virus.

La expresión *in vivo* de un polipéptido FVII modificado puede incluir enlazar operativamente una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido FVII modificado a secuencias reguladoras específicas tal como un promotor específico de células o específico de tejido. Los polipéptidos FVII modificados también se pueden expresar de vectores que afectan y/o se replican específicamente en tipos de células objetivo y/o tejidos. Los promotores inducibles se pueden usar para regular selectivamente la expresión del polipéptido FVII modificado. Un sistema de expresión regulable ejemplar es el sistema de expresión de genes inducibles por doxiciclina, la cual se ha usado para regular la expresión FVII recombinante (Srour *yy colaboradores* (2003) Thromb Haemost. 90(3): 398-405).

Las moléculas de ácido nucleico, como ácidos nucleicos desnudos o en vectores, cromosomas artificiales, liposomas y otros vehículos se pueden administrar al sujeto mediante la administración sistémica, tópica, local y otras vías de administración. Cuando es sistémica e *in vivo*, la molécula de ácido nucleico o vehículo que contiene la molécula de ácido nucleico se puede fijar como objetivo a una célula.

000289

La administración también se puede dirigir, tal como mediante la administración de un vector o células que fijan como objetivo típicamente una célula o tejido. Por ejemplo, las células de tumor y proliferantes se pueden fijar como objetivo las células para la expresión in vivo de los polipéptidos FVII modificados. Las células usadas para la expresión *in vivo* de un polipéptido FVII modificado también incluyen células autólogas al paciente. Estas células se pueden remover de un paciente, ácidos nucleicos para la expresión de un polipéptido FVII modificado introducido, y luego administrar a un paciente tal como mediante inyección o injerto.

H. Usos terapéuticos

Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden usar para el tratamiento de cualquier condición para la cual se emplea el FVII recombinante. Típicamente, estos tratamientos incluyen aquellos donde la coagulación incrementada, tal como respuestas hemostáticas incrementadas, son deseadas. Los polipéptidos FVII modificados tienen actividad terapéutica sola o en combinación con otros agentes. Los polipéptidos proporcionado en este documento se diseñan para retener la actividad terapéutica pero exhiben propiedades modificadas, particularmente resistencia incrementada a AT-III y actividad catalítica incrementada. Los polipéptidos proporcionado en este documento también pueden exhibir resistencia incrementada a TFPI, resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+}, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tal como vida media en suero, enlace y/o afinidad incrementada para las plaquetas activadas,

320

enlace y/o afinidad incrementada para la albúmina de suero, y/o enlace y/o afinidad incrementada para la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$. Estas propiedades modificadas, por ejemplo, pueden mejorar la efectividad terapéutica de los polipéptidos debido a la actividad coagulante implementada de los polipéptidos FVII modificados. Esta sección proporciona usos ejemplares de y métodos de administración. Estas terapias descritas son ejemplares y no limitan las aplicaciones de los polipéptidos FVII modificados.

Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden usar en varios métodos terapéuticos así como también métodos de diagnóstico en los cuales el FVII se emplea. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, métodos de tratamiento de condiciones fisiológicas y médicas descritas y listadas posteriormente. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento pueden exhibir la mejora de las actividades *in vivo* y los efectos terapéuticos comparados con el FVII de tipo silvestre, que incluye dosificación más baja para lograr el mismo efecto, y otras mejoras en la administración y tratamiento tal como pocas y/o menos administraciones frecuentes, efectos secundarios disminuidos y efectos terapéuticos incrementados. Aunque se entiende que los polipéptidos FVII modificados se pueden administrar como un zimógeno de FVII (*es decir*, forma de cadena individual), típicamente los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se administran en forma de dos cadenas activadas después, por ejemplo, la autoactivación o activación por otros factores de coagulación, tal como durante la purificación.

321

En particular, los polipéptidos FVII modificados se proponen para el uso en métodos terapéuticos en los cuales el FVII se ha usado para el tratamiento. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, métodos de tratamiento de enfermedades y trastornos, tales como, pero no se limitan a, trastornos de coagulación de la sangre, trastornos hematológicos, trastornos de sangrado, hemofilias, tal como hemofilia A, hemofilia B y deficiencia del factor VII, y trastornos de la sangre adquiridos, tal como deficiencia de factor VII adquirida causada por la enfermedad del hígado. Los polipéptidos FVII modificados también se pueden usar en el tratamiento de enfermedades y trastornos de sangrado adicionales, tal como, pero no se limita a, trombocitopenia (*por ejemplo*, tal como debido a los regímenes quimioterapéuticos), enfermedad de Von Willebrand, trastornos de plaquetas hereditarios (*por ejemplo*, enfermedad de acumulación de almacenamiento tal como síndromes de Chediak-Higashi y Hermansky-Pudlak, disfunción A2 de tromboxano, trombastenia de Glanzmann, y síndrome de Bernard-Soulier), síndrome hemolítico-urémico, Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria, también conocida como síndrome de Rendu-Osler-Weber, púrpura alérgica (púrpura de Henoch Schonlein) y coagulación intravascular diseminada.

En algunas modalidades, las hemorragias que se tratan por los polipéptidos FVII ocurren en órganos tales como el cerebro, región del oído interno, ojos, hígado, pulmones, tejido de tumores, tracto gastrointestinal. En otras modalidades, la hemorragia se difunde, tal como gastritis hemorrágica y hemorragia uterina profusa. Los pacientes con trastornos de

000292

sangrado, tal como por ejemplo, hemofilia A y B, frecuentemente están en riesgo de complicaciones hemorrágicas durante la cirugía o trauma. Esta hemorragia se puede manifestar como hemartrosis (hemorragias en las articulaciones), artropatía hemofílica crónica, hematomas, (*por ejemplo,* musculares, retroperitoneales, sublinguales y retrofaríngicos), hematuria (hemorragia del tractor renal), hemorragias del sistema nervioso central, hemorragias gastrointestinal (*por ejemplo,* sangrados UGI) y hemorragia cerebral, la cual también se puede tratar con polipéptidos FVII modificados. Adicionalmente, cualquier hemorragia asociada con la cirugía (*por ejemplo,* hepatectomía), o extracción dental se pueden tratar con polipéptidos FVII modificados. En una modalidad, los polipéptidos FVII modificados se pueden usar para tratar episodios de hemorragia debido a un trauma, o cirugía, o disminuir el conteo o actividad de las plaquetas en un sujeto. Los métodos ejemplares para pacientes que se someten a la cirugía incluyen tratamientos para evitar hemorragias y tratamientos antes, y durante, o después de la cirugía tal como, pero no se limita a, cirugía del corazón, angioplastia, cirugía de los pulmones, cirugía abdominal, cirugía espinal, cirugía del cerebro, cirugía vascular, cirugía dental, o cirugía del trasplante de órganos, que incluyen trasplante de médula ósea, corazón, pulmones, páncreas o hígado.

El tratamiento de enfermedades y condiciones con polipéptidos FVII modificados se puede efectuar mediante cualquier vía adecuada de administración usando formulaciones adecuadas como se describen en este documento que incluyen,

323

000293

pero no se limitan a, inyección, administración pulmonar, oral y transdérmica. El tratamiento se efectúa típicamente mediante la administración de bolo intravenoso.

Si es necesario, una dosificación particular y duración y protocolo de tratamiento se pueden determinar o extrapolar empíricamente. Por ejemplo, las dosis ejemplares de polipéptidos FVII recombinantes y nativos se puede usar como un punto de partica para determinar dosificaciones apropiadas. Por ejemplo, un polipéptido FVII recombinante (rFVIIa) que ha sido activado a rFVIIa, NovoSeven^{MR}, se ha administrado a pacientes con hemofilia A o hemofilia B, quienes están experimentado un episodio hemorrágico, en una dosificación de 90 µg/kg mediante la infusión de bolo durante 2 a 5 minutos, logrando un nivel de circulación efectivo de por lo menos 2 µg/ml, con una vida media promedio de 2.7 horas. La dosis se repite cada 2 horas hasta que se logra la hemostasis. Los polipéptidos FVII modificados que son tienen una actividad coagulante incrementada, debido a, por ejemplo, la resistencia incrementada a AT-III, actividad catalítica incrementada, resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+}, resistencia incrementada a TFPI, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media del suero incrementada, enlace y/o afinidad incrementada para las plaquetas activadas, enlace y/o afinidad incrementada para la albúmina de suero, y/o enlace y/o actividad incrementada para la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$, puede ser efectivo en cantidades de dosificación reducidas y/o frecuencias comparadas con este FVII recombinante. Las dosificaciones para el tipo silvestre o

324

000294

polipéptidos FVII no modificados se puede usar como guía para determinar las dosificaciones para los polipéptidos FVII modificados. Los factores tales como el nivel de actividad y la vida media del FVII modificado en comparación con FVII no modificado se pueden usar en hacer estas determinaciones. Las dosificaciones y regímenes particulares se pueden determinar empíricamente.

Los niveles y regímenes de dosificación se pueden determinar con base en las dosificaciones y regímenes conocidos, y, si es necesario se pueden extrapolar con base en los cambios en las propiedades de los polipéptidos y/o se pueden determinar empíricamente con base en una variedad de factores. Estos factores incluyen peso corporal del individuo, salud general, edad, la actividad del compuesto específico empleado, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, la gravedad y curso de la enfermedad, y la disposición del paciente a la enfermedad y la evaluación del médico tratante. El ingrediente activo, el polipéptido, típicamente se combina con un portador farmacéuticamente efectivo. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una forma de dosificación individual o una forma de múltiples dosificaciones puede variar dependiendo del hospedero tratado y el modo particular de administración.

El efecto de los polipéptidos FVII en el tiempo de coagulación de la sangre se puede supervisar usando cualquiera de las pruebas de coagulación conocidas en el campo que incluyen, pero no se limitan a, tiempo de la protrombina de

325

sangre entera (PT), tiempo de la tromboplastina parcial activada (aPTT), el tiempo de la coagulación activada (ACT), el tiempo de la coagulación activada recalcificada o el tiempo de la Coagulación de Lee-White.

En la mejora de la condición de un paciente, se puede administrar una dosis de mantenimiento de un compuesto o composiciones, si es necesario; y la dosificación, la forma de dosificación, o frecuencia de administración, o una combinación de los mismos se puede modificar. En algunos casos, un sujeto puede requerir un tratamiento intermitente sobre una base a largo plazo en cualquier recurrencia de los síntomas de enfermedad o con base en las dosificaciones programadas. En otros casos, se pueden requerir administraciones adicionales en respuesta a eventos agudos tal como hemorragia, trauma o procedimientos quirúrgicos.

Las siguientes son unas condiciones ejemplares para lo cual el FVII (administrado como FVIIa) se ha usado como un agente de tratamiento solo o en combinación con otros agentes.

1. Trastornos de sangrado congénitos

a. Hemofilia

La hemofilia congénita es un trastorno de la sangre recesivo en el cual existen niveles disminuidos de factores de coagulación en el plasma, conduciendo a la interrupción de la cascada de coagulación y el tiempo de coagulación de la sangre incrementado. La hemofilia A, que toma en cuenta aproximadamente 85% de todos los casos de hemofilia, resulta de la(s) mutación(es) en el gen del factor VIII en el cromosoma X, conduciendo a una deficiencia o disfunción de la proteína

326

FVIII. La hemofilia B es causada por una deficiencia o disfunción del factor de coagulación, FIX, que resulta generalmente de mutaciones o supresiones puntuales en el gen FIX sobre el cromosoma X. La incidencia mundial de la hemofilia A es aproximadamente 1 caso por 5000 individuos hombres, y 1 caso por 25000 mujeres para la hemofilia B. la hemofilia A y B se clasifican además como leves, moderadas, o graves. Un nivel de plasma con 5%-25% del factor VIII o IX que funcionan normalmente se clasifica como leve, 1%-5% es moderado, y menor que 1% es grave. La hemofilia C, frecuentemente referida como deficiencia de FIX, es relativamente una enfermedad leve y rara, que afecta aproximadamente 1 en 100000 personas de una manera recesiva autosomal.

La hemofilia A y B se manifiesta clínicamente en muchas formas. Cortes menores y abrasiones no darán por resultado sangrado excesivo, pero traumas y cirugías lo harán. El paciente también tendrá numerosos sangrados articulares y musculares y fácil aparición de moretones. La hemartrosis o hemorragia dentro de las articulaciones es una de las complicaciones principales en la hemofilia, y pueden ocurrir espontáneamente o en respuesta a un trauma. Las articulaciones en bisagra, tales como la rodilla, codo y tobillo, son afectadas más frecuentemente. La cadera y el hombro se afectan mucho menos frecuentemente que la rótula y la articulación del receptáculo tiene más musculatura que la circunda, protegiéndolas de esta manera más de la lesión. La hemorragia puede causar dolor agudo grave, restringir el movimiento, y conduce a complicaciones secundarias que incluyen hipertrofia

327

sinovial. Adicionalmente, la hemorragia ocurrente en las articulaciones puede causar sinovitis, crónica, la cual puede causar daño de la articulación, destrucción del sinovio, cartílago, y hueso. Las hemorragias que ponen en peligro la vida, tal como hemorragia intracraneal y sangrado en el sistema nervioso central, también afectan a sujetos hemofílicos. El sangrado intracraneal ocurre en aproximadamente 10% de pacientes con hemofilia grave, dando por resultado un 30% de tasa de mortalidad. En contraste, la hemofilia C es más leve. Los sangrados espontáneos se observan raramente, y el sangrado dentro de las articulaciones, tejidos y músculos blandos tampoco es común. El sangrado se trata generalmente con transfusión de plasma congelado reciente (FFP), terapia de reemplazo de FXI, o, para el tratamiento tópico, tal como tratamiento de heridas externas o extracciones dentales, pegamento de fibrina.

El tratamiento más común para la hemofilia A o B es la terapia de reemplazo, en la cual el paciente se le administra FVIII o FIX. Las formulaciones son comercialmente disponibles como productos derivados de plasma o recombinantes, con proteínas recombinantes que ahora son el tratamiento de selección en los pacientes previamente no tratados. Mientras que estas terapias pueden ser muy exitosas, surgen complicaciones y el paciente desarrolla inhibidores al factor VIII o factor IX recientemente administrado. Los inhibidores son anticuerpos IgG, la mayoría de la subclase IgG4, que reaccionan con el FVIII o FIX e interfieren con la función procoagulante. Los inhibidores afectan aproximadamente 1 en 5

328

pacientes con hemofilia A grave. La mayoría de sujetos desarrollan estos inhibidores tan pronto después de la administración de las primeras infusiones del factor VIII, lo cual es frecuentemente temprano en la niñez, aunque los sujetos los desarrollan después en la vida. Los inhibidores también afectan aproximadamente 1 de 15 personas con hemofilia A leve o moderada. Estos inhibidores se desarrollan usualmente durante la edad adulta y no solo destruyen los exógenos FVIII administrados, sino también destruyen el FVIII endógeno. Como resultado, los hemofílicos leves y moderados se vuelven graves. Clínicamente, los pacientes con hemofilia A con inhibidores se clasifican en respondedores altos y bajos de acuerdo con la resistencia de la respuesta anamnésica que experimentan cuando se vuelven a exponer a FVIII. Los inhibidores afectan aproximadamente 1 de 100 pacientes con hemofilia B. En la mayoría de casos, los inhibidores se desarrollan después de las primeras infusiones del factor IX terapéutico y se pueden acompañar por reacciones alérgicas.

Los polipéptidos FVII modificados presentados en este documento se pueden usar para tratar pacientes con hemofilia, particularmente pacientes con hemofilia con inhibidores. Un producto FVIIa recombinante (NovoSeven^{MR}, Novo Nordisk) se ha probado y autorizado para el tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A o B con inhibidores a FVIII o FIX y para la prevención de hemorragias en prevenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con hemofilia A o B con inhibidores a FVIII o FIX. El tratamiento con rFVIIa mejora la generación de la trombina mientras que

329

deriva el requerimiento para FVIIIa y/o FIXa. La coagulación se inicia en el sitio de la lesión mediante la interacción de rFVIIa con TF, dando por resultado la activación de FX inicial, la generación de trombina y la activación de las plaquetas. La coagulación completa por rFVIIa se puede efectuar por los mecanismos dependientes de TF e independientes de FX donde algunas de las trombinas generadas pueden resultar de la activación directa de rFVIIa solo, el cual por sí mismo se enlaza a las plaquetas activadas a través de interacciones de baja afinidad con las membranas del fosfolípido.

Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden usar en terapias para la hemofilia, que incluyen el tratamiento de episodios hemorrágicos y la prevención de la hemorragia en las intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos. Los polipéptidos FVII modificados en este documento pueden proporcionar resistencia incrementada a AT-III, actividad catalítica incrementada, resistencia incrementada a los efectos inhibidores de Zn^{2+}, resistencia incrementadas a TFPI, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tal como vida media del suero, enlace y/o afinidad incrementada para las plaquetas activadas, enlace y/o afinidad incrementada para la albúmina de suero, y/o enlace y/o afinidad incrementada para la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$. Los Polipéptidos FVII pueden exhibir por lo tanto actividad coagulante más alta de una manera dependiente de TF (tal como a través de la resistencia incrementada a TFPI), y/o una manera independiente de TF (tal como a través del enlace y/o afinidad incrementada para las plaquetas activadas. De esta manera, los polipéptidos

330

FVII modificados se pueden usar para suministrar terapias más activas para la hemofilia. Ejemplos de mejoras terapéuticas que usan polipéptidos FVII modificados incluyen por ejemplo, pero no se limitan a, dosificaciones más bajas, pocas y/o menos administraciones frecuentes, efectos secundarios disminuidos y efectos terapéuticos incrementados.

Los polipéptidos FVII modificados se administran típicamente como polipéptidos FVII activados (FVIIa). Los polipéptidos FVII modificados se pueden someter a prueba para la efectividad terapéutica, por ejemplo, mediante el uso de modelos animales. Por ejemplo los ratones hemofílicos inducidos con anticuerpos, o cualquier otro modelo de enfermedad para la hemofilia, se pueden tratar con polipéptidos FVII modificados. La progresión de los síntomas de enfermedad y fenotipos se supervisa para estimar los efectos de los polipéptidos FVII modificados. Los polipéptidos FVII modificados también se pueden administrar a sujetos tales como en ensayos clínicos para estimar la efectividad *in vivo* en comparación con los controles de placebo y/o controles que usan el FVII modificado.

b. Deficiencia de FVII

La deficiencia del factor VII es un trastorno hemorrágico recesivo autosomal que afecta aproximadamente 1 de 500000 personas. La deficiencia de FVII puede ser clínicamente leve, moderada o grave, con deficiencia leve a moderada caracterizada por hemorragia incrementada después de la cirugía y trauma. Los pacientes con deficiencia FVII grave (menor que 1% de actividad de FVII) experimentan síntomas similares a la hemofilia. Por ejemplo, los sujetos deficientes de FVII están propensos a

331

sangrados articulares, hemorragias nasales espontáneas, hemorragia gastrointestinal, hemorragia del tracto urinario. La hemorragia intracerebral y los sangrados musculares también se han reportado, mientras que las mujeres pueden experimentar menorragia grave (sangrado menstrual pesado). El tratamiento se puede efectuar mediante la terapia de reemplazo. Un producto FVIIa recombinante (NovoSeven^{MR}, Novo Nordisk) se ha probado y autorizado para el tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con deficiencia de FVII congénita y para la prevención de hemorragia en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con deficiencia de FVII congénita. Por consiguiente, los polipéptidos FVII modificados en este documento se pueden usar similarmente. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden usar en el tratamiento de episodios hemorrágicos y la prevención de hemorragia e intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en los pacientes deficientes de FVII. Por ejemplo, un paciente neonatal que se presenta con deficiencia FVII grave con hemorragia intracraneal se le puede administrar polipéptidos FVII modificados mediante bolo intravenoso para efectuar la coagulación y mantener la hemostasis. Generalmente los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

c. Otros

Otros trastornos de sangrado se pueden tratar con los polipéptidos FVII proporcionado en este documento para promover la coagulación. Las deficiencias congénitas de los factores V y X también se presentan con tiempos incrementados de coagulación

332

de la sangre y se pueden tratar potencialmente con la administración de dosis terapéuticas de FVII. Por ejemplo, un paciente con deficiencia de factor X se le puede administrar rFVIIa para controlar la hemorragia asociada con la esplenectomía (Boggio *y colaboradores* (2001) Br J Haematol 112:1074-1075). Los episodios hemorrágicos espontáneos y asociados con la cirugía, asociados con la enfermedad de von Willebrand (vWD) también se pueden tratar usando los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento. El VWD es un trastorno hemorrágico causado por un efecto de eficiencia de la proteína de coagulación de la sangre, el Factor von Willebrand (vWF), y se estima que ocurre de 1% a 2% de la población. Los sujetos con vWD se les forman moretones fácilmente, tienen hemorragias nasales recurrentes, sangran después de la extracción de dientes, tonsilectomía y otra cirugía, y pacientes mujeres pueden tener hemorragia menstrual incrementada. Los polipéptidos FVII modificados se pueden usar para mejorar hemorragia espontánea y asociada con la cirugía en pacientes con vWD (von Depka *y colaboradores* (2006) Blood Coagul Fibrin 17:311-316). Otros trastornos de sangrado relacionados con plaquetas, tal como por ejemplo, trombastenia de Glanzmann y síndrome de Hermansky-Pudlak también se asocian con actividad de coagulación endógena regresiva. La hemorragia espontánea en exceso o asociada con la cirugía en pacientes con trastornos de sangrado relacionados con plaquetas también se pueden controlar por las dosis terapéuticas de los polipéptidos FVII modificados. Por ejemplo, un paciente con trombastenia de Glanzmann que es somete a la cirugía se puede tratar antes,

333

durante y/o después de la cirugía con los polipéptidos FVII modificados para prevenir mayor pérdida de sangre (van Buuren *y colaboradores* (2002) Dig Dis Sci 47:2134-2136). Generalmente, los polipéptidos FVII modificados es administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

2. Trastornos de sangrado adquiridos

a. Trombocitopenia adquirida por quimioterapia

Los trastornos de sangrado pueden ser adquiridos en vez de congénitos. Por ejemplo, el tratamiento de quimioterapia, tal como para la leucemia y otros cánceres puede dar por resultado trombocitopenia. Esto es probablemente debido a la pérdida de la producción de plaquetas en la médula ósea de pacientes que reciben la quimioterapia, y ocurre típicamente 6-10 días después de la medicación. El tratamiento de la trombocitopenia adquirida es usualmente por plaquetas, glóbulos rojos o transfusión de plasma, lo cual sirve para prevenir cualquier hemorragia simultánea anormal que puede resultar de la deficiencia de plaquetas. La hemorragia en pacientes con trombocitopenia inducida por quimioterapia, o cualquier otra trombocitopenia adquirida o congénita, también se puede controlar mediante la administración de cantidad terapéutica de los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento. Por ejemplo, un paciente trombocitopénico con hemorragia descontrolada, tal como en el tracto gastrointestinal, se le puede administrar una inyección de bolo intravenosa de una cantidad terapéutica de polipéptido FVII para detener la hemorragia (Gerotziafas *y colaboradores* (2002) Am J Hematol 69:219-222). Generalmente, los polipéptidos FVII

334

modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

b. Otras coagulopatías

Otras coagulopatías adquiridas se pueden tratar usando los polipéptidos FVII modificados presentados en este documento. La coagulopatía puede resultar de condiciones que incluyen, pero no se limitan a, falla hepática fulminante (FHF; tal como la causada por fármacos hepatóxicos, toxinas, enfermedades metabólicas, enfermedades infecciosas e isquemia) otra enfermedad del hígado, que incluye cirrosis y enfermedad asociada con enfermedad de Wilson, deficiencia de vitamina K (tal como causada por tratamiento con antibióticos o dieta), síndrome urémico hemolítico, trombocitopenia trombótica (TTC) y coagulopatía intravascular diseminada (DIC). El tratamiento convencional es generalmente mediante la transfusión con plasma, glóbulos rojos (RBC), o plaquetas, pero puede ser no exitosa. En una modalidad, los polipéptidos FVII modificados se pueden administrar a un paciente con FHF que se someten a procedimientos invasivos para evitar la hemorragia. El tratamiento convencional con plasma congelado reciente (FFP) es frecuentemente no exitoso y puede requerir grandes cantidades de plasma, produciendo sobrecarga de volumen y anasarca (una infiltración generalizada de fluido de edema dentro del tejido conjuntivo subcutáneo). El tratamiento con cantidades terapéuticas de polipéptidos FVII modificados mediante bolo intravenoso durante, después y/o después de la cirugía invasiva, tal como por ejemplo, biopsia de hígado o trasplante de hígado, pueden prevenir la hemorragia y establecer la

335

hemostasis en pacientes con FHF. El paciente se puede supervisar mediante PT de la sangre para determinar la eficacia del tratamiento (Shami *y colaboradores* (2003) Liver Transpl 9:138-143). En otra modalidad, el FVII se puede administrar a un paciente con hemorragia grave asociada con la coagulopatía, tal como por ejemplo, hemorragia intra-abdominal grave después de la cesárea asociada con la disfunción del hígado y DIC, que no respondió a las infusiones de las transfusiones convencionales (Moscardo *y colaboradores* (2001) Br J Haematol 113:174-176). Además, los polipéptidos FVII modificados se pueden usar para tratar una coagulopatía en pacientes neonatales y pediátricos. En una modalidad particular, los pacientes neonatales y pediátricos no responden al tratamiento convencional como, tal como RBC e infusión de plaquetas. Por ejemplo, los neonatos con hemorragia pulmonar grave asociada con PTs incrementado quienes no responden a RBC y la transfusión de plaquetas se les puede administrar polipéptidos FVII modificados para disminuir el PT y establecer la hemostasis (Olomu *y colaboradores* (2002) J Perinatol 22:672-674). Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento exhiben actividad de coagulación mejorada comparados con los polipéptidos FVII no modificados, y se pueden administrar por lo tanto, por ejemplo, en dosis más bajas, menos frecuentemente, y pocas reacciones adversas. Generalmente los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

c. Sangrado adquirido por trasplantes

El sangrado grave después del trasplante de médula ósea

(BMT) y trasplante de células madre (SCT) es una complicación relativamente común y que pone en peligro la vida asociada con estos procedimientos, debido a la reducción de las plaquetas. Por ejemplo, la hemorragia alveolar difusa (DAH) es una complicación pulmonar de BMT con incidencia estimada de 1-21% en la población de trasplante, y una tasa de mortalidad de 60-100%. El tratamiento convencional de estos episodios hemorrágicos incluye el tratamiento con corticosteroides y transfusión con plasma, plaquetas y/o RBC, aunque estos son grandemente no exitosos con una tasa de mortalidad total de aproximadamente 50% (Hicks *y colaboradores* (2002) Bone Marrow Transpl 30:975-978). La administración de FVII mediante bolo intravenoso, con o sin tratamiento concurrente con corticosteroides y/o infusión de plaquetas, se puede realizar para tratar la DAH y establecer la hemostasis (Hicks *y colaboradores* (2002) Bone Marrow Transpl 30:975-978). Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento exhiben actividad de coagulación mejorada comparados con los polipéptidos FVII no modificados, y se podrían administrar, por lo tanto, por ejemplo en dosis más bajas, menos frecuentemente, durante una duración de tratamiento más corto, y con pocas reacciones adversas para la misma actividad y eficacia biológica. Generalmente los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

d. Sangrado inducido por terapia con anticoagulantes

Los pacientes que se someten a terapias con anticoagulantes para el tratamiento de condiciones, tal como tromboembolismo, pueden exhibir episodios hemorrágicos en la

337

administración aguda de anticoagulantes, tal como warfarina, heparina y fondaparinox, o desarrollan trastornos de sangrado como un resultado del uso a largo plazo de estas terapias. Los tratamientos para episodios hemorrágicos incluyen típicamente la administración de procoagulantes, tal como vitamina K, plasma, FIX exógeno, y protaminas para neutralizar la heparina. La administración del FVII exógeno también se puede realizar para neutralizar el efecto de los anti-coagulantes, incrementar el PT, aPTT, y/u otros marcadores de coagulación y establecer la hemostasis (Deveras *y colaboradores* (2002) Ann Inten Med 137:884-888). Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden usar en tratamientos para controlar los episodios hemorrágicos en pacientes con trastornos de sangrado adquiridos debido a tratamientos con anticoagulantes. Generalmente los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

e. Hemofilia adquirida

Los inhibidores del factor VIII pueden desarrollarse espontáneamente en individuos de otra manera sanos, dando por resultado una condición conocida, como "hemofilia adquirida". La hemofilia adquirida es una condición rara, con una incidencia de 0.2-1.0 al año por millón de la población. Los anticuerpos son principalmente anticuerpos IgG4, los cuales, cuando se enlazan a FVIII, inhiben la actividad de FVIII al interferir con la escisión de la trombina, la interacción del factor von Willebrand y/o el enlace de fosfolípidos. Esto da por resultado hemorragia que pone en peligro la vida en aproximadamente 87% de pacientes afectados. Los sitios comunes

338

de hemorragia son la piel, la mucosa, músculos y retroperitoneo, en contraste con pacientes con hemofilia hereditaria quienes sangran predominantemente en las articulaciones y músculos. La hemofilia adquirida se puede tratar con un concentrado de complejo de protrombina activado o factor VII activado recombinante (NovoSeven^{MR}, Novo Nordisk) para controlar los episodios hemorrágicos. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento exhiben actividad de coagulación mejorada comparados con los polipéptidos FVII no modificados, y se puede administrar, por lo tanto, por ejemplo, en dosis más bajas, menos frecuentes, durante una duración de tratamiento más corto, y con pocas reacciones adversas para la misma actividad y eficacia biológica. Generalmente los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

3. Sangrado por trauma y quirúrgico

Los polipéptidos FVII se pueden usar como terapia para tratar el sangrado asociado con la pérdida de sangre perioperativa y traumática en sujetos con sistemas de coagulación normales. Por ejemplo, los polipéptidos FVII se pueden administrar a un paciente para promover la coagulación y reducir la pérdida de sangre asociada con la cirugía, además, reducen el requerimiento de trasfusión de sangre. En una modalidad, los polipéptidos FVII se pueden administrar a sujetos que se someten a la prostatectomía retropúbica. La prostatectomía retropúbica se asocia frecuentemente con pérdida de sangre mayor y una necesidad subsecuente de transfusión. Los sujetos que se someten a esta cirugía o similar se les puede

339

suministrar un bolo intravenoso de una cantidad terapéutica de FVII en la fase operativa temprana para reducir la pérdida de sangre perioperativa al mejorar la coagulación en el sitio de la cirugía. La reducción en la pérdida de sangre da por resultado la eliminación de la necesidad de transfusión de sangre en estos pacientes (Friederich *y colaboradores* (2003) Lancet 361:201-205). Los polipéptido FVII se pueden administrar a pacientes con coagulación normal que se someten a otros tipos de cirugía para efectuar la hemostasis rápida y prevenir la pérdida de sangre. Ejemplos no limitantes de procedimientos quirúrgicos en los cuales el FVII, típicamente administrado en la forma activada (*es decir* FVIIa), se puede usar una terapia para reducir en la hemorragia perioperativa incluyen, pero no se limitan a, cirugía de válvula cardíaca (Al Douri *y colaboradores* (2000) Blood Coag Fibrinol 11:S121-S127), reemplazo de válvula aórtica (Kastrup *y colaboradores* (2002) Ann Thorac Surg 74:910-912), resección de hemangiopericitoma recurrente (Gerlach *y colaboradores* (2002) J Neurosurg 96:946-948), cirugía de cáncer (Sajdak *y colaboradores* (2002) Eur J Gynaecol Oncol 23:325-326), y cirugía sobre úlceras duodenales (Vlot *y colaboradores* (2000) Am J Med 108:421-423). El tratamiento con FVII puede promover la hemostasis en el sito de la cirugía y reducir o prevenir la pérdida de sangre, reduciendo o aboliendo en consecuencia la necesidad de transfusión. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento son diseñados para exhibir actividad de coagulación mejorada comparados con los polipéptidos FVII no modificados, y podrían ser administrados por lo tanto, por

340

ejemplo, en dosis más bajas, menos frecuentemente, y con pocas reacciones adversas. Generalmente los polipéptidos FVII modificados se administran polipéptidos FVII activados (FVIIa).

Los polipéptidos del factor VII también se pueden usar para promover la coagulación y prevenir la pérdida de sangre en sujetos con lesión traumática. El trauma se define como una lesión al tejido viviente por un agente extrínseco, y es la cuarta causa conducente de muerte en los Estados Unidos. El trauma se clasifica como ya sea trauma cerrado (que da por resultado la compresión interna, daño de órganos y hemorragia interna), o trauma penetrativo (una consecuencia de un agente que penetra el cuerpo y destruye tejidos, vasos y órganos, dando por resultado hemorragia externa. El trauma puede ser causado por diversos eventos que incluyen, pero no se limitan a, accidentes vehiculares (que causan trauma cerrado y/o penetrativo), heridas de disparos de armas (que causan trauma penetrativo), heridas de apuñalamiento (que causan trauma penetrativo), accidentes con maquinaria (que causan trauma penetrativo y/o cerrado), y caídas de alturas significativas (que causan trauma penetrativo y/o cerrado). La hemorragia descontrolada como un resultado de trauma es responsable de la mayoría de la mortalidad asociada. La coagulopatía difusa es una complicación relativamente común asociada con pacientes con trauma, que ocurre en tanto como 25-36% de sujetos. La coagulopatía puede desarrollarse temprano después de la lesión, dando por resultado una variedad de factores tal como dilución y consumo de factores de coagulación y plaquetas, fibrinólisis, acidosis, e hipotermia. El manejo convencional implica la

341

terapia de reemplazo mediante la transfusión con plaquetas de plasma congelado reciente (FFP), RBC y/o crioprecipitados, acidosis de corrección, y tratamiento de hipotermia. Estas etapas son frecuentemente insuficientes para detener la hemorragia y prevenir la muerte. El tratamiento mediante la administración de cantidades terapéuticas de FVII puede promover la coagulación y reducir la pérdida de sangre en pacientes con trauma. Por ejemplo, un paciente con una lesión de disparo de arma que se presenta con sangrado masivo, además de la intervención quirúrgica, se le administra FVII para controlar la hemorragia coagulopática (Kenet *y colaboradores* (1999) Lancet 354:1879). La terapia coagulante con FVII puede reducir efectivamente la pérdida de sangre y la hemorragia en pacientes con trauma cerrado y penetrante. (Rizoli *y colaboradores* (2006) Crit Care 10:R178). Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se diseñan para exhibir actividad de coagulación mejorada comparados con los polipéptidos FVII no modificados, y se podrían administra por lo tanto por ejemplo, en dosis más bajas, menos frecuentemente, y con pocas reacciones adversas. Generalmente los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

I. **Terapias de combinación.**

Cualquiera de los polipéptidos FVII modificados descritos en este documento se pueden administrar en combinación con, antes de, intermitentemente con, o subsecuentemente a, otros agentes o procedimientos terapéuticos que incluyen, pero no se limitan a, otros agentes biológicos, compuestos de moléculas

342

pequeñas y cirugía. Para cualquier enfermedad o condición, que incluyen todas aquellas ejemplificadas anteriormente, por lo cual el FVII (que incluye FVIIa y rFVIIa) se indica o se ha usado y por lo cual otros agentes y tratamiento están disponibles, el FVII se puede usar en combinación con los mismos. Por consiguiente, los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento se pueden usar similarmente. Dependiendo de la enfermedad o condición que se trata, las combinaciones ejemplares incluyen, pero no se limitan a, una combinación con otros factores de coagulación purificados o recombinantes en plasma, procoagulantes, tal como Vitamina K, derivado de vitamina K e inhibidores de proteína C, plasma, plaquetas, glóbulos rojos y corticosteroides.

J. Artículos de manufactura y kits

Los compuestos farmacéuticos de polipéptidos FVII modificados o ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos FVII modificados, o un derivado o una porción biológicamente activa del mismo se pueden empaquetar como artículos de manufactura que contienen material de empaque, una composición farmacéutica que es efectiva para tratar una enfermedad o trastorno hemostático, y una etiqueta que indica el polipéptido FVII modificado o molécula de ácido nucleico se va a usar para tratar la enfermedad o trastorno hemostático.

Los artículos de manufactura proporcionados en este documento contienen materiales de empaque. Los materiales de empaque para el uso en los productos farmacéuticos de empaque son bien conocidos por aquellas personas expertas en el campo. Véase, por ejemplo, Patentes de E.U.A. Nos. 5,323,907,

343

5,052,558 y 5,033,352, cada una de las cuales se incorpora en este documento en su totalidad. Ejemplos de materiales de empaque farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, paquetes de ampollas, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, frasquitos, contenedores, jeringas, botellas, y cualquier material de empaque adecuado para una formulación seleccionada y modo propuesto de administración y tratamiento. Se contempla un amplio arreglo de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionadas en este documento como son una variedad de tratamientos para cualquier enfermedad o trastorno hemostático.

Los polipéptidos FVII modificados y las moléculas de ácido nucleico también se proporcionan como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en este documento y un artículo para la administración. Por ejemplo un FVII modificado se puede suministrar con un dispositivo para la administración, tal como una jeringa, un inhalador, una copa de dosificación, un gotero, o un aplicador. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones para la aplicación que incluyen dosificaciones, regímenes de dosificación e instrucciones para los modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en este documento y un artículo de paradiagnóstico. Por ejemplo, estos kits pueden incluir un artículo para medir la concentración, cantidad o actividad del FVII o un sistema regulado por FVII de un sujeto.

Los siguientes ejemplos se incluyen para propósitos ilustrativos únicamente y no se proponen para limitar el

alcance de la invención.

K. Ejemplos

Ejemplo 1

Clonación y expresión de FVII

A. Clonación de FVII

Los nucleótidos que codifican el polipéptido precursor de isoforma FVII humano de 466 aminoácidos (P08709; establecidos en SEQ ID NO:1) se clonaron en el vector de expresión de mamífero, pCMV Script (Stratagene; SEQ ID NO: 99), que contiene un promotor de citomegalovirus (CMV). Brevemente, el CBO-125 (SEQ ID NO: 100) y oligonucleótidos CBO-126 (SEQ ID NO: 101) se usaron como cebadores delanteros e inversos, respectivamente, para amplificar la secuencia FVII por PCR usando cADN FVII humano (Invitrogen) como la plantilla. El cebador CBO-125 contenido en un sitio de restricción BamHI (en negrita), una secuencia Kozak (subrayado doble), seguido por 18 nucleótidos con homología al extremo 5' de la secuencia de cADN FVII (subrayado), que incluye el codón de inicio ATG. El cabador CBO-126 contenido en un sitio de restricción EcoRI (en negrita), un cocón de detención (subrayado doble) y 21 nucleótidos con homología al extremo 3' de la secuencia de cADN FVII (subrayado).

cebador delantero CBO-125

5' gcatcatgacgtgac**ggatcc**gccaccatggtctcccaggccctc 3'

345

cebador inverso CBO-126

5' gatcgtacgatacgtg**aattc**ctagggaaatggggctcgcaggag 3'

La reacción PCR estándar y condiciones de termociclado se usaron en conjunto con el kit KoD HiFi PCR (EMD Biosciences), como se recomendó por el fabricante. El producto PCR se digirió con enzimas de restricción BamH I y EcoR I y ligó en los sitios de restricción BamH I y EcoR I de vector pCMV Script usando técnicas moleculares estándar. El vector se transformó luego en *Escherichia coli*. Las colonias seleccionadas se cultivaron y células bacterianas cosechadas para purificación del plásmido usando técnicas de biología molecular de rutina.

B. Generación de Variantes FVII

Las variantes FVII se generaron usando el kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio QuikChange II XL (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, con oligonucleótidos específicamente diseñados que sirven como cebadores que incorporan una mutación particular en ADN nuevamente sintetizado. El método QuikChange implica amplificación lineal de ADN de plantilla por la polimerasa de ADN de alta fidelidad PfuUltra. Los cebadores complementarios que incluyen la mutación deseada se extendieron durante el ciclo usando vector pCMV Script superenrollado de hebra doble, purificado que contenía la secuencia de cADN FVII clonada como una plantilla. La extensión de los cebadores resultó en la incorporación de la mutación de interés en las hebras nuevamente sintetizadas, y resultó en un plásmido mutado con puntos críticos escalonados. Después de la amplificación, el ácido nucleico se trató con Dpn I, que digiere las hebras parentales dam-metiladas del vector pCMV Script derivado de *E. coli*. Esto resultó en

346

"selección" de los plasmidos mutados nuevamente sintetizados, que no se metilaron. El ADN del vector que contiene las mutaciones deseadas se transformaron en células de *E. coli* ultracompetentes XL10-Gold, donde la ligasa bacteriana reparó los bastoncillos y permitió que se produjera replicación normal.

La Tabla 13 abajo establece las variantes FVII que se generaron. En algunas instancias, las variantes FVII se generaron en las cuales una secuencia de enlace para integrina de plaqueta $\alpha_{IIb}\beta_3$ se insertó en varias regiones del polipéptido FVII. Una de las tres diferentes secuencias de enlace de integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ se insertaron: SFGRGDIRNV (SEQ ID NO: 110); CSFGRGDIRNVC (SEQ ID NO: 111); o GGGSCSFGRGDIRNVC (SEQ ID NO: 112). Las secuencias de enlace de integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ se insertaron en la terminal C del polipéptido FVII después del residuo de aminoácido P406 al numerar FVII maduro, o insertar por eliminación y reemplazo de residuos de aminoácido FVII S103 a S111, H115 a S126 o T127 a P134 al numerar FVII maduro. Otras variantes FVII en las cuales una secuencia de enlace de albumina de suero se insertó también se generaron. Estas variantes FVII contenían una de siete diferentes secuencias de enlace de albumina de suero:
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID NO: 103), IEDICLPRWGCLWE (SEQ ID NO: 104), DICLPRWGCLWED (SEQ ID NO: 105), IEDICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 106), GGGSIEDICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 107), DICLPRWGCLWED (SEQ ID NO: 108), o GGGSDICLPRWGCLWED (SEQ ID NO: 109). Las secuencias de enlace de albumina de suero se insertaron en la terminal C del polipéptido FVII después del residuo de aminoácido P406 al numerar FVII maduro, o insertar por eliminación y reemplazo de residuos de aminoácido FVII S103 a S111, H115 a S126 o T128 a

P134 al numerar FVII maduro. Las variantes FVII "Gla Intercambio FIX" (esto es, un polipéptido FVII en el cual el dominio Gla endógeno se ha reemplazado con el dominio Gla de FIX) contienen residuos de aminoácido Y1 a Y45 de SEQ ID NO: 83 en la terminal N. En algunos ejemplos, las variantes "Gla Intercambio FIX" contienen una o más sustituciones de aminoácido en la porción de dominio Gla FIX. Las mutaciones que están en la porción de dominio Gla FIX se encierran en llaves y se hace referencia usando posiciones de aminoácido que corresponden a las posiciones de aminoácido de un polipéptido FIX tipo silvestre maduro, o el dominio FIX Gla tipo silvestre establecido en SEQ ID NO:83. Por ejemplo, {Gla Intercambio FIX/M19K} significa que el polipéptido FVII modificado contiene un dominio Gla FIX heterólogo en el cual la metionina en la posición 19 del dominio Gla FIX establecido en SEQ ID NO:83 se reemplaza con una lisina. En la Tabla 13 abajo, los residuos de aminoácido en los cuales la integrina de plaqueta $\alpha\pi_b\beta_3$ o secuencia de enlace de albumina de suero se inserta en el polipéptido FVII, y la secuencia de aminoácido de la secuencia de enlace, se representan ambos. Por ejemplo, H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF indica que los residuos de aminoácido H115 thru S126 se han eliminado y reemplazado con una secuencia de enlace de albumina de suero con la secuencia de aminoácido QRLMEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID NO:103).

348

000319

Tabla 13. Variantes de Factor VII

Variante (numeración de FVII maduro	Variante (Numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO de poli-péptido FVII
Tipo natural	Tipo natural	3
Q286N	Q143N	113
Q286E	Q143E	114
Q286D	Q143D	115
Q286S	Q143S	116
Q286T	Q143T	117
Q286R	Q143R	118
Q286K	Q143K	119
Q286A	Q143A	120
Q286V	Q143V	121
Q286M	Q143M	122
Q286L	Q143L	123
Q286Y	Q143Y	124
Gla Intercambio de FIX/Q286R	Gla Intercambio de FIX/Q143R	131
H257A/Q286R	H117A/Q143R	132

000319

Variante (numeración de FVII maduro	Variante (Numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO de poli-péptido FVII
S222A/Q286R	S82A/Q143R	133
S222A/H257A/Q286R	S82A/H117A/Q143R	134
Gla Intercambio de FIX/S222A/Q286R	Gla Intercambio de FIX/S82A/Q143R	135
Gla Intercambio de FIX/H257A/Q286R	Gla Intercambio de FIX/H117A/Q143R	136
Gla Intercambio de FIX/S222A/H257A/ Q286R	Gla Intercambio de FIX/S82A/H117A/ Q143R	137
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	138
Q286R/M298Q/K341Q	K192Q/Q143R/M156Q	139
K199E/Q286R/M298Q	K60cE/Q143R/M156Q	140
Gla Intercambio de FIX/Q286R/M298Q	Gla Intercambio de FIX/Q143R/M156Q	141
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V	142
Q286R/A292N/A294S/Q366V	Q143R/A150N/A152S/Q217V	143
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	144
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V	145
H257S/Q286R	H117S/Q143R	146
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	147
S222A/H257A/Q286R/Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	148
Q286R/H373A	Q143R/H224A	149
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	150
V158D/E296V/M298Q	V158D/E296V/M298Q	158
Q286R/K341D	Q143R/K192D	151
Q286R/Q366D	Q143R/Q217D	152
Q286R/Q366N	Q143R/Q217N	153
Q286R/M298Q/Q366D	Q143R/M156Q/Q217D	154
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	155
Q286R/H373F	Q143R/H224F	156
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	157
T239S	T99S	159
T239N	T99N	160
T239Q	T99Q	161
T239V	T99V	162
T239L	T99L	163
T239H	T99H	164
T239I	T99I	165
P321K	P170iK	166
P321E	P170iE	167
P321Y	P170iY	168
P321S	P170iS	169
Q366D	Q217D	170
Q366E	Q217E	171
Q366N	Q217N	172
Q366T	Q217T	173
Q366S	Q217S	174
Q366V	Q217V	175
Q366I	Q217I	176
Q366L	Q217L	177

350

Variante (numeración de FVII maduro	Variante (Numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO de poli-péptido FVII
Q366M	Q217M	178
H373D	H224D	179
H373E	H224E	180
H373S	H224S	181
H373F	H224F	182
H373A	H224A	183
Q366D/H373E	Q217D/H224E	184
Q366V/H373V	Q217V/H224V	185
Q366V/H373L	Q217V/H224L	186
Q366V/H373I	Q217V/H224I	187
K161S	K24S	188
K161A	K24A	189
K161V	K24V	190
H216S	H76S	191
H216A	H76A	192
H216K	H76K	193
H216R	H76R	194
S222A	S82A	195
S222K	S82K	196
S222V	S82V	197
S222D	S82D	200
S222N	S82N	198
S222E	S82E	199
H257A	H117A	201
H257S	H117S	202
S222K/H257A	S82K/H117A	203
H216A/H257A	H76A/H117A	204
H216A/S222A	H76A/S82A	205
S52A	S[52]A	206
S60A	S[60]A	207
E394N/P395A/R396S	E245N/P246A/R247S	208
R202S	R62S	209
A292N/A294S	A150N/A152S	210
G318N	G170fN	211
A175S	A39S	212
K109N	K-26N	213
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	214
A51N	A-84N	215
T130N/E132S	T[130]N/E[132]S	216
S50A/S62A	S[50]A/S[62]A	217
A122N/G124S/E394N/P395A/R396S	A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/R247S	218
A122N/G124S/E394N/P395A/R396S/ G318N	A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/R247S/G170fN	219
S52N/P54S	S[52]N/P[54]S	220
S119N/L121S	S[119]N/L[121]S	221

351

Variante (numeración de FVII maduro	Variante (Numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO de poli-péptido FVII
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	222
Q66N/Y68S	Q[66]N/Y[68]S	223
S52N/P54S/A122N/G124S/E394N/P395A/R396S	S[52]N/P[54]S/A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/R247S	224
K109N/A292N/A294S	[K109N] /A150N/A152S	225
K109N/A175S	[K109N] /A39S	226
V158T/L287T/M298K	V21T/L144T/M156K	256
V158D/L287T/M298K	V21D/L144T/M156K	257
S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	S[103]S[111]delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	227
H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	H[115]S[126]delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	228
T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	T[128]P[134]delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	229
S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE	S[103]S[111]delinsIEDICLPRWGCLWE	230
H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE	H[115]S[126]delinsIEDICLPRWGCLWE	231
T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE	T[128]P[134]delinsIEDICLPRWGCLWE	232
S103S111delinsDICLPRWGCLWED	S[103]S[111]delinsDICLPRWGCLWED	233
H115S126delinsDICLPRWGCLWED	H[115]S[126]delinsDICLPRWGCLWED	234
T128P134delinsDICLPRWGCLWED	T[128]P[134]delinsDICLPRWGCLWED	235
P406insIEDICLPRWGCLW	P257insIEDICLPRWGCLW	236
P406insGGGSIEDICLPRWGCLW	P257insGGGSIEDICLPRWGCLW	237
P406insDICLPRWGCLWED	P257insDICLPRWGCLWED	238
P406insGGGSDICLPRWGCLWED	P257insGGGSDICLPRWGCLWED	239
S103S111delinsSFGRGDIRNV	S[103]S[111]delinsSFGRGDIRNV	240
H115S126delinsSFGRGDIRNV	H[115]S[126]delinsSFGRGDIRNV	241
T127P134delinsSFGRGDIRNV	T[128]P[134]delinsSFGRGDIRNV	242
P406insCSFGRGDIRNVC	P257insCSFGRGDIRNVC	243
P406insGGGSCSFGRGDIRNVC	P257insGGGSCSFGRGDIRNVC	244
Gla Intercambio de FIX/S222A	Gla Intercambio de FIX/S82A	245
Gla Intercambio de FIX/H257A	Gla Intercambio de FIX/H117A	246
Gla Intercambio de FIX/S222A/H257A	Gla Intercambio de FIX/S82A/H117A	247
S222A/M298Q	S82A/M156Q	248
H257A/M298Q	H117A/M156Q	249
S222A/H257A/M298Q	S82A/H117A/M156Q	250
S222A/A292N/A294S/Q366V	S82A/A150N/A152S/Q217V	251
A175S/S222A/Q366V	A39S/S82A/Q217V	252

352

Variante (numeración de FVII maduro	Variante (Numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO de poli-péptido FVII
S222A/Q366V	S82A/Q217V	253
H257S/Q366V	H117S/Q217V	254
S222A/H373A	S82A/H224A	255
S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V	S[103]S[111]delinsIEDICLPRWGCLWE/G97V	258
S103S111delinsDICLPRWGCLWED/G237V	S[103]S[111]delinsDICLPRWGCLWED/G97V	259
H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V	H[115]S[126]delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G97V	260
H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V	H[115]S[126]delinsIEDICLPRWGCLWE/G97V	261
H115S126delinsDICLPRWGCLWED/G237V	H[115]S[126]delinsDICLPRWGCLWED/G97V	262
T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V	T[128]P[134]delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G97V	263
T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V	T[128]P[134]delinsIEDICLPRWGCLWE/G97V	264
S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V	S[103]S[111]delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G97V	265
T128P134delinsDICLPRWGCLWED/G237V	T[128]P[134]delinsDICLPRWGCLWED/G97V	266
S103S111delinsSFGRGDIRNV/G237V	S[103]S[111]delinsSFGRGDIRNV/G97V	267
H115S126delinsSFGRGDIRNV/G237V	H[115]S[126]delinsSFGRGDIRNV/G97V	268
T128P134delinsSFGRGDIRNV/G237V	T[128]P[134]delinsSFGRGDIRNV/G97V	269
M298Q/H373F	M156Q/H224F	270
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	271
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	272
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	273
{GlaIntercambiodeFIX/E40L}/Q286R/M298Q	{GlaIntercambiodeFIX/E[40]L}/Q143R/M156Q	274
{GlaIntercambiodeFIX/K43I}/Q286R/M298Q	{GlaIntercambiodeFIX/K[43]I}/Q143R/M156Q	275
{GlaIntercambiodeFIX/Q44S}/Q286R/M298Q	{GlaIntercambiodeFIX/Q[44]S}/Q143R/M156Q	276
{GlaIntercambiodeFIX/M19K}/Q286R/M298Q	{GlaIntercambiodeFIX/M[19]K}/Q143R/M156Q	277
{GlaIntercambiodeFIX/M19K/E40L/K43I/Q44S}/Q286R/M298Q	{GlaIntercambiodeFIX/M[19]K/E[40]L/K[43]I/Q[44]S}/Q143R/M156Q	278
T128N/P129A/Q286R	T[128]N/P[129]A/Q143R	279
T128N/P129A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	280
T128N/P129A/Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H224F	281
V158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	282
T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q	T[128]N/P[129]A/V21D/E154V/M156Q	283

353

Variante (numeración de FVII maduro	Variante (Numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO de poli-péptido FVII
T128N/P129A/S222A	T[128]N/P[129]A/S82A	284
GlaIntercambiodeFIX/T128N/P129A/S222A/Q286R	GlaIntercambiodeFIX/T[128]N/P[129]A/S82A/Q143R	285
GlaIntercambiodeFIX/T128N/P129A/Q286R/M298Q	GlaIntercambiodeFIX/T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	286
T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/H117A/Q143R/M156Q	287
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/H224F	288
S52A/S60A/V158D/E296V/M298Q	S[52]A/S[60]A/V21D/E154V/M156Q	289
S52A/S60A/Q286R	S[52]A/S[60]A/Q143R	290
S52A/S60A/S222A	S[52]A/S[60]A/S82A	291
GlaIntercambiodeFIX/S52A/S60A/S222A/Q286R	GlaIntercambiodeFIX/S[52]A/S[60]A/S82A/Q143R	292
S52A/S60A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q	293
S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H117A/Q143R/M156Q	298
S52A/S60A/Q286R/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/H224F	296
S52A/S60A/ Q286R/M298Q/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q/H224F	297
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	298
T239V/Q286R	T99V/Q143R	299
S222A/T239V	S82A/T99V	300
GlaIntercambiodeFIX/S222A/T239V/Q286R	GlaIntercambiodeFIX/S82A/T99V/Q143R	301
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	302
S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q	303
GlaIntercambiodeFIX/T239V/Q286R/M298Q	GlaIntercambiodeFIX/T99V/Q143R/M156Q	304
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	305
T239V/Q286R/M298Q/H373F	T99V/Q143R/M156Q/H224F	306
V158D/T239I/E296V/M298Q	V21D/T99I/E154V/M156Q	307
T239I/Q286R	T99I/Q143R	308
S222A/T239I	S82A/T99I	309
GlaIntercambiodeFIX/S222A/T239I/Q286R	GlaIntercambiodeFIX/S82A/T99I/Q143R	310
T239I/Q286R/M298Q	T99I/Q143R/M156Q	311
S222A/T239I/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99I/H117A/Q143R/M156Q	312
GlaIntercambiodeFIX/T239I/Q286R/M298Q	GlaIntercambiodeFIX/T99I/Q143R/M156Q	313
T239I/Q286R/H373F	T99I/Q143R/H224F	314
T239I/Q286R/M298Q/H373F	T99I/Q143R/M156Q/H224F	315
GlaIntercambiodeFIX/S222A/Q286R/H373F	GlaIntercambiodeFIX/S82A/Q143R/H224F	316
GlaIntercambiodeFIX/S222A/Q286R/M298Q	GlaIntercambiodeFIX/S82A/Q143R/M156Q	317
GlaIntercambiodeFIX/S222A/Q286R/M298Q/H373F	GlaIntercambiodeFIX/S82A/Q143R/M156Q/H224F	318

Variante (numeración de FVII maduro	Variante (Numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO de poli-péptido FVII
V158D/E296V/M298Q/H373F	V21D/E154V/M156Q/H224F	319
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F	V21D/Q143R/E154V/M156Q/H224F	320
H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	321
H257S/Q286R/M298Q	H117S/Q143R/M156Q	322
GlaIntercambiodeFIX/S222A/H257S/Q286R	GlaIntercambiodeFIX/S82A/H117S/Q143R	323
S222A/H257S/Q286R/M298Q	S82A/H117S/Q143R/M156Q	324
H257S/Q286R/M298Q/H373F	H117S/Q143R/M156Q/H224F	325
S222A/Q286R/M298Q/H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	326
GlaIntercambiodeFIX/Q366V	GlaIntercambiodeFIX/Q217V	327
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	328
T128N/P129A/A175S/Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/Q217V	329
A122N/G124S/A175S/Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/Q217V	330
T128N/P129A/A175S/S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A	331
A122N/G124S/A175S/S222A	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A	332
T128N/P129A/A175S/Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R	333
A122N/G124S/A175S/Q286R	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R	334
GlaIntercambiodeFIX/T128N/P129A/A175S/S222A/Q286R	GlaIntercambiodeFIX/T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/Q143R	335
Gla Intercambio FIX/A122N/G124S/A175S/S222A/Q286R	GlaIntercambiodeFIX/A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/Q143R	336
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156Q	337
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q	338
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	339
A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	340
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156Q/H224F	341
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q/H224F	342
T128N/P129A/M298Q	T[128]N/P[129]A/M156Q	354
{Gla Intercambio de FIX/K431}/T128N/P129A/Q286R/M298Q	{GlaIntercambiodeFIX/K[43]I}/T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	355
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N	356
{Gla Intercambio de FIX/K431}/Q286R/M298Q/Q366N	{GlaIntercambiodeFIX/K[43]I}/Q143R/M156QQ217N	357
{Gla Intercambio de FIX/K431}/T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N	{GlaIntercambiodeFIX/K[43]I}/T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q Q217N	358
T128N/P129A/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/M156Q/H224F	359
V158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	360

355

Variante (numeración de FVII maduro	Variante (Numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO de poli-péptido FVII
M298Q/Q366N/H373F	M156Q/Q217N/H224F	361
T239V/M298Q/H373F	T99V/M156Q/H224F	362
T239I/M298Q/H373F	T99I/M156Q/H224F	363
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N/H224F	364
T239V/Q286R/M298Q/Q366N	T99V/Q143R/M156Q/Q217N	365
T239I/Q286R/M298Q/Q366N	T99I/Q143R/M156Q/Q217N	366
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q	367
T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q	368
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q/H224F	369
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M156Q	370
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M156Q/H224F	371

C. Expresión de polipéptidos FVII

Para análisis de expresión inicial por ELISA y técnica Western blot, los polipéptidos FVII se expresaron en células BHK-21. Para ensayos bioquímicos, tal como aquellas descritas abajo, los polipéptidos FVII se expresaron en células Freestyle™ 293-F (Invitrogen).

El polipéptido Factor VII tipo silvestre (SEQ ID NO:3) y polipéptidos FVII variantes se expresaron inicialmente en la línea de célula de riñón de hámster bebe BHK-21 (ATCC CRL 1632). Las células BHK-21 se cultivaron en Eagle's medio esencial mínimo (EMEM, Invitrogen) con 10% de suero de bovino fetal (FCS) en placas de cultivo 100mm a 37°C y CO_2 al 5%. Después del crecimiento a aproximadamente 90% de confluencia, las células se transfectaron con 24 µg de ADN de plásmido FVII

356

usando el kit de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) segun las instrucciones del fabricante. El medio se reemplazó 6 horas después de la transfección con EMEM sin suero que contiene vitamina K1 1 µg/ml (Sigma) y las células se incubaron durante 72 horas adicionales. La expresión de FVII en el medio de cultivo celular se probó por ELISA o Manchado Western.

Para análisis posterior usando ensayos bioquímicos, el polipéptido Factor VII tipo silvestre (SEQ ID NO:3) y polipéptidos FVII variantes se expresaron en células Freestyle™ 293-F (Invitrogen). Las células se cultivaron en medio Freestyle™ 293 (Invitrogen) a 37°C y CO_2 al 8% en matraces Erlenmeyer con tapas de ventilación. Las células se transfectaron usando el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, después del crecimiento a 1 x 10 células/ml, las células se centrifugaron y el medio se intercambio. Las células luego se transfectaron con 240 µg de ADN de plásmido FVII para cada 240 ml de células usando 293 fectina (Invitrogen). Además, 50 µl de una solución de reserva 1 mg/ml de Vitamina K) (Sigma) en etanol se agregó para cada 240 ml de células. Las células se cultivaron durante 5 días luego el sobrenadante de cultivo se cosechó. La expresión de FVII en el medio de cultivo celular se probó por ELISA.

En algunos ejemplos, polipéptidos FVII variantes y tipo silvestre se expresaron en células CHO-Express (CHOX) (Excellgene). Las células CHO Express (CHOX) se mantuvieron en medio Completo DM202 (SAFC BioSciences) y usaron para inocular cultivos de producción de semilla. Los cultivos de semilla se cultivaron a 5 x 10^6 células viables/mL y aproximadamente 60 mL

357

se usó para inocular aproximadamente Medio completo 0.6 L DM202 (densidad de inoculación es 0.4 x 10^6 vc/mL) para generar un cultivo de producción. Este cultivo de producción se cultivó durante 4 días para alcanzar 8-12 x 10^6 vc/mL en el día de la transfección. Un complejo de transfección se formó usando ADN plásmido Factor VII (6 mg) y 23.1 mg de Polietilenimina (PEI). El complejo de transfección se diluyó luego en 0.5 L de medio de transfección Opti-MEM libre de suero (Invitrogen), que se agregó al cultivo de producción 0.6 L. Después de 5 horas de transfección el cultivo se diluyó además con medio ProCHO5 ~1 L (Lonza) complementado con 8 mM L-glutamina y 4 mg/L Vitamina K1. El cultivo en el matraz de agitación 2.2L se permitió expresar durante 5 - 7 días antes de cosechar el Factor VII crudo. Los sobrenadantes de cultivo se cosecharon luego por filtración y FVII se purificó.

La expresión de una de las variantes FVII (Q286R/M298Q) se realizó en una línea celular estable. Esta línea se generó en Excellgene (Monthey, Valais, Switzerland) por la transfección de células CHOX. Brevemente, las células se cultivaron en la presencia de metotrexato, luego se fijaron en places por limitación de dilución en 1 célula por pozo en placas de 96 pozos. Los clones que producen los niveles más altos de variante FVII se determinaron por ELISA. Un clon (clon 52) se sub-clonó por una segunda dilución de limitación y se fijo en placas en placas de 96 pozos. Las colonias se cultivaron en 37°C en medio DM204A (SAFC BioSciences), complementado con 8 mM L-glutamina, cisteina 1 mM, vitamina K11 mg/L. Veinticuatro clones se encontraron que tienen mayores niveles de expresión

Q286R/M298Q, por análisis ELISA, que el clon original 52. Estos 24 clones se expandieron además en placas de 6 pozos durante 6 días de crecimiento, seguido por crecimiento en matraces de agitación 40 mL durante cuatro días. Cada etapa de crecimiento se hizo a 37°C en medio DM204A, complementado como arriba. Después de los cuatro días de crecimiento, clones se congelaron en 1 x 10^7 células viables/mL. Los niveles de Q286R/M298Q producidos por cada clon se determinaron por ELISA. El clon 5F7 fue el mayor productor, típicamente generando 25 - 35 mg/L Q286R/M298Q.

1. ELISA

Se usó un inmunoensayo para cuantificar la cantidad de FVII humano y FVIIa en una muestra. Los anticuerpos policlonales para FVII humano se usaron para capturar y detectar la proteasa en la solución. El inmunoensayo se puede usar para determinar concentración de proteína de medio condicionado o una solución de reserva purificada o para determinar la concentración de FVII en otra muestra, por ejemplo, una muestra de plasma de ratón o humano. La concentración de línea base de FVII en sangre humana es aproximadamente 50 nM y la forma enzimáticamente activa, FVIIa, es aproximadamente 1 nM.

Para determinar la cantidad de FVII humano o proteína FVIIa en las muestras se realizó un ELISA tipo sandwich. Inmuno placas Maxisorp de fondo plano de noventa y seis pozos (Nunc) se recubrieron con 100 µl/pozo de 5 ng/µl avidina (NeutrAvidin, Pierce Biotech.). Las placas se cubrieron e incubaron con

359

agitación durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) después de enjuagar cuatro veces en PBS con 0.01% Tween-20 (PBST). Las placas se bloquearon durante un mínimo de 1 hora a TA con agitación por incubación con albumina de suero de bovino 1% (BSA) (p/v) en PBS agregado a cada pozo en 200 µl/pozo. Las placas bloqueadas se almacenaron luego a 4°C hasta su uso (hasta 2 semanas).

Antes de usar, las placas se lavaron cuatro veces en PBST para remover el BSA, y 100 µl/pozo de una solución 1 ng/µl de anticuerpo anti-Factor VII biotinilado (R&D Systems) se agregó a cada pozo y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos con agitación para permitir la formación de complejos con la avidina recubierta. El exceso de anticuerpo no enlazado se removió al lavar la placa con PBST (cuatro veces).

Diluciones dobles en serie de un FVII estándar (American Diagnostica; diluido en PBST), varían desde 50 ng/µl hasta 0.8 ng/µl, se agregaron a la placa en 100 µl/placa. Una placa que contiene PBST sin ningún FVII también se incluyó como una solución amortiguadora solamente de control. Para muestras purificadas de ensayo (antes y después de la activación, ver Ejemplo 3) de FVII o FVIIa, la muestra se diluyó primero 1:25 en PBST, y luego se hicieron diluciones 2 veces en serie de modo que se probaron diluciones de 25 veces, 50 veces, 100 veces y 200 veces. Las muestras diluidas se agregaron a los pozos en duplicado en 100 µl/pozo. Para muestras de plasma de ensayo que contienen FVII o FVIIa, la muestra de plasma se diluyó 1:100 y 1:400 en PBST y se agregó a los pozos en duplicado en 100 µl/pozo. Una muestra de plasma sin FVII o FVIIa también se incluyó para determinar niveles

360

de base. Las placas se incubaron luego durante 30 minutos a TA con agitación para permitir cualquier FVII o FVIIa en la muestra a complejo con el anticuerpo anti-FVII.

Después de la incubación con muestra, las placas se lavaron 4 veces con PBST. Un anticuerpo secundario, FVII anti-humano de Equino o FVII anti-humano monoclonal de Murino (American Diagnostica), se diluyó 1:5000 en PBST y se agregó a cada pozo en un volumen de 100 µl. Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación para permitir al anticuerpo agregado enlazar a los complejos FVII o FVII en la placa. Para remover el exceso, las placas se lavaron con PBST (4 veces). Para detectar el anticuerpo secundario de enlace, 100 µl de conjugado HRP anti-equino de cabra en una dilución 1:5000 en PBST, o 100 µl de conjugado HRP anti-ratón de cabra en una dilución 1:20,000 en PBST se agregó a cada pozo. Después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación, las placas se lavaron cuatro veces con PBST y 100 µl/pozo de una solución que contiene una mezcla 1:1 de sustrato TMB y se agregó solución de peróxido de hidrógeno (Pierce Biotech.). Las placas se agitaron durante aproximadamente 1 minuto a temperatura ambiente antes de la adición de 100 µl/pozo de H_2SO_4 2M para detener la reacción. La densidad óptica en 450 nm se midió usando un lector de Placa M5 de Dispositivo Molecular y el valor de base para la placa (medido con PBST solamente) se restó del valor medido de cada pozo. Una curva estándar se generó al trazar la concentración de los estándares FVII contra la absorbancia. Un rango de curva estándar de alrededor de 0.2 - 50 ng/ml se generó típicamente bajo las condiciones ELISA anteriores. La concentración de cada muestra se

361

determinó luego usando la curva estándar y multiplicando por el factor de dilución, y se reportó una desviación estándar promedio.

2. Manchado Western

La expresión de FVII en medios de cultivo celular también se probó por manchado Western. Las alícuotas que contienen la muestra no diluida, o dos diluciones 2 veces en serie en PBS, del medio de cultivo celular de células transfectadas FVII (BHK-21 o células CHOX) se etiquetaron Conc. 1 (no diluido), Conc. 2 (dilución 2 veces) y Conc. 3 (dilución 4 veces). Las muestras se cargaron en un gel de SDS page junto a 10, 25, y 50 nanogramos de plasma de control purificado rFVII (American Diagnostica). La proteína FVII producida por células BHK-21 o CHOX se detectó por manchado Western usando un anticuerpo anti-FVII de equino policlonal primario (American Diagnostica; usado en la concentración sugerida por el fabricante) y un anticuerpo secundario IgG anti-equino conjugado HRP (una dilución 1:2000 de solución 1 mg/ml de Zymed Laboratories). En algunos ejemplos, el FVII se detectó por manchado Wester usando un anticuerpo Factor VIIa anti-humano de conejo primario (Hematologic Technologies) y un anticuerpo secundario IgG anti-conejó conjugado HRP (Invitrogen). La comparasión de niveles de expresión se hizo con el plasma de control purificado rFVII. Los resultados muestran que las concentraciones varían desde alrededor de 20 ng hasta más de 50 ng de FVII se presentó en las alicuotas de cultivo celular.

Ejemplo 2

Purificación y activación de polipéptidos FVII

Los polipéptidos FVII se purificaron usando un Flujo Rápido de Sefarosa Q, o columna CaptoQ (GE Healthcare), a cuyos

362

polipéptidos FVII con dominios Gla funcionales adsorberá, seguido por una etapa de elución de calcio. Típicamente, el sobrenadante de cultivo de lo transfectado se diluyó 2 veces con una solución que contiene 20 mM Tris pH 8.0 y 0.01% Tween 20, y luego 500 mM EDTA pH 8.0 se agregó a la muestra diluida a una concentración final de 1.5 mM. Las muestras se filtraron antes de que se caragaran sobre el Flujo Rápido de Sefarosa Q o columna CaptoQ, que se ha pre-equilibrado primero con Solución amortiguadora B (20 mM Tris pH 8.0, NaCl 1 M, 0.01% Tween 20), luego Solución amortiguadora A (20 mM Tris pH 8.0, NaCl 0.15 M, 0.01% Tween 20). Después de que se cargó, la columna se lavó con Solución amortiguadora A hasta que la absorbancia del flujo a través de 280 nm alcanzó una línea base. La Solución amortiguadora A se reemplazó con Solución amortiguadora C (20 mM Tris pH 8.0, NaCl 0.15 M, 0.01% Tween 20, 5 mM $CaCl_2$) y se realizó un lavado de bomba para reemplazar completamente la solución amortiguadora en las líneas. Una vez finalizado el lavado de bomba, se aplicó Solución amortiguadora C a la columna en 8 ml/min para eluir los polipéptidos FVII, que se colectaron en fracciones. Después de la elución, la columna se lavó con Solución amortiguadora B mientras todavía se colectaron las fracciones, hasta que el pigmento rosa (de los medios de cultivo) se lavó completamente de la columna. La columna se lavó luego con Solución amortiguadora A para re-equilibrar esto para re-usar.

Las fracciones eluidas se purificaron además usando una columna Mono Q o QHiTrap (GE Healthcare), que se pre-equilibró inicialmente con Solución amortiguadora B, y luego con Solución amortiguadora A. Las fracciones colectadas con solución

363

amortiguadora C anteriores, que contienen FVII, se agruparon y diluyeron 2 veces con Solución amortiguadora A, antes de EDTA, pH 8.0 se agregó a una concentración final de 40 mM. Pequeñas alicuotas (por ejemplo, 100µl) se tomaron opcionalmente en este punto para análisis, tal como por ELISA. La muestra combinada se cargó sobre la columna Mono Q (o QHiTrap), luego se lavó con Solución amortiguadora A. Para eluir los polipéptidos FVII de enlace, un gradiente de 0% hasta 30% de la Solución amortiguadora B se corrió a través de la columna y las fracciones se colectaron. La columna se lavó luego con Solución amortiguadora B seguido por Solución amortiguadora A para re-equilibrar para re-usar.

En algunos ejemplos, después de la primera columna Capto Q, las fracciones agrupadas fueron solución amortiguadora intercambiada por diafiltración a Solución amortiguadora D (20 mM MES, pH 6.0, CaCl2 10 mM, NaCl 0.1 M, 0.01% Tween 20) luego cargadas sobre una columna SP-HP que se ha pre-equilibrado con Solución amortiguadora D. Después de lavar con Solución amortiguadora D, un gradiente de NaCl 0.1 M hasta NaCl 1.0M se aplicó a la columna y las fracciones se colectaron. Las Fracciones que contienen FVII se ajustaron luego a pH 8.0 y diluyeron 2 veces en Solución amortiguadora E (20 mM Tris, pH 8.0, CaCl2 10 mM, 0.01% Tween 20) y aplicaron a una columna Q H-HP que se ha pre-equilibrado con Solución amortiguadora E. Esta columna se lavó luego con Solución amortiguadora E y el FVII se eluyó por un gradiente de NaCl 0 - 1M en Solución amortiguadora E.

Los polipéptidos FVII purificados se activaron a FVIIa usando Factor Xa biotinilado del kit de Remoción y Escisión de Factor Xa de Proteasa de Restricción (Roche). Típicamente, 7

fracciones de la purificación Mono Q se agruparon en un tubo cónico 15 ml y se agregaron 388 µl de $CaCl_2$ 500 mM, 38.9 µl de BSA 10% en agua destilada, y 3.2 µg de Factor Xa biotinilado. Después de la incubación durante 14-16 hrs a 37°C, 250 µl de Avidina Inmovilizada (Pierce) se agregó y la muestra se mezcló a 4°C durante 30 minutos. La solución resultante se filtró luego a través de una columna Econo-pak (Bio-Rad), y el filtrado se mezcló con otro 250 µl de Avidina Inmovilizada durante 30 minutos adicionales. La solución se filtró nuevamente y el filtrado se concentró a aproximadamente 300-500 µl usando un filtro Amicon Ultra-4 10kDa filtro centrífugo (Millipore). La concentración FVIIa se analizó luego por ELISA (como se describió en el Ejemplo 1.C.1) y el nivel de la activación del Factor VII se vigiló por manchado Western. El manchado Western se realizó esencialmente como se describió en el Ejemplo 1.C.2, sino que por el contrario usando anticuerpo de Factor VIIa anti-humano de conejo (Haematologic Technologies, Inc.) en 1:2000 durante 1 hr como el anticuerpo primario, seguido por IgG Anti-Conejo de Cabra HRP (H+L) (Invitrogen) en 1:5000 durante 30 minutos.

Ejemplo 3

Determinación de la concentración de Proteasa Catalíticamente Viable en una Solución

La concentración de FVIIa catalíticamente viable en una solución de reserva se determinó al triturar un complejo de Factor VIIa y Factor de Tejido soluble (sTF) con un inhibidor de péptido irreversible de FVIIa, Phe-Phe-Arg-Clorometilcetona (FFR- CMK). El inhibidor se enlaza a FVIIa pero no a FVII. La incubación

365

extendida en una alta concentración de FVIIa (50 nM) asegura titulación completa de la proteasa. La actividad residual del complejo FVIIa/TF después de la incubación con FFR-CMK se midió para determinar la concentración de FVIIa catalíticamente viable en la solución de reserva original.

La placa de ensayo de la mitad de área clara de 96 pozos (Nunc) se pre-trató al agregar 150 µl/pozo de 1 x solución amortiguadora de placa (100 mM Tris pH 8.4, NaCl 100 mM, BSA 0.01%, Tween-20 0.01%) a cada pozo e incubar la placa a 37°C durante 1 mínimo de 1 hora. La solución amortiguadora se removió completamente por manchado en una toalla de papel y se centrifugó la placa al revés para remover cualquier solución amortiguadora restante, y la placa se secó al aire durante 1 hora y almacenó cubierta a temperatura ambiente (TA).

Para preparar la mezcla de reacción FVIIa/sTF/FFR-CMK, una solución de reserva FVIIa (American Diagnostica; diluida a 5 µM en glicerol al 50% (v/v) y almacenada fría en alícuotas a -20°C) o una variante FVIIa se diluyó primero a 500 nM en solución amortiguadora de ensayo directo 1 x (100 mM Tris pH 8.4, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 5 mM, BSA 0.01%). La mezcla FVIIa/sTF se hizó luego al mezclar 90 µl de agua destilada con 36 µl solución amortiguadora de ensayo directo 5 x, 18 µl FVIIa 500 nM, y 18 µl sTF 5 µm (Factor III de Coagulación humano recombinante/factor de tejido soluble; R&D Systems; la solución de reserva usada fue 19.6 µM en glicerol al 50% y se diluyó a 5 µM en solución amortiguadora de ensayo directo 1 x y almacenó hasta dos semanas a 4°C). Los componentes se permitieron luego para complejo durante 5 minutos a temperatura ambiente.

366

Una solución de reserva de 10 mM FFR-CMK (BaChem) en DMSO (almacenada a -20°C) se diluyó en agua a 3.5 µM. Usando una fila de una placa de almacenamiento opaca de polipropileno (Costar), diluciones dobles en serie en agua del FFR-CMK se hicieron a través de 11 pozos de una placa opaca de 96 pozos, con el último pozo de la fila que contiene solamente agua como un control. Esto es la solución en serie de inhibidor 10^X FFR-CMK. En cada pozo de una fila de la placa de ensayo de la mitad de área clara de 96 pozos pre-tratada, 10.8 µl de la mezcla FVIIa/sTF se agregó, seguido por 1.2 µl de las series de inhibidor 10x FFR-CMK. Las soluciones se mezclaron bien y la placa se centrifugó a <3000 rpm durante 5 minutos para remover las gotas en los pozos. La placa se cubrió e incubó durante 8 horas a 37°C.

Para el análisis de la actividad residual del complejo FVIIa/TF, una mezcla del sustrato de Espectrozima FVIIa (American Diagnostica, #217L; solución de reserva reconstituida de vial 50 µmole en 5 mL de agua destilada a 10 mM y almacenada a 4°C) y solución amortiguadora directa 5X (500 mM Tris pH 8.4, NaCl 500 mM, $CaCl_2$ 25 mM y BSA 0.05%) primero se preparó al mezclar 360 µl solución amortiguadora de ensayo directo 5 x con 180 µl de una solución 10 mM de FVIIa Espectrozima y 1080 µl de agua. A cada pozo de la placa de ensayo, 108 µl de la solución de sustrato preparada se agregó. Los pozos se mezclaron y la placa se incubó a 37°C. El incrementó en absorbancia a 405 nm se midió cada 30 segundos durante una hora a 37°C en un lector de placa Spectramax Gemini M5 de Dispositivos Moleculares.

Usando software SoftMax Pro (Dispositivos Moleculares), las velocidades de absorbancia se midieron y la actividad fraccional

de proteasas incubadas con un inhibidor se determinó al dividir la velocidad medida por la velocidad de la proteasa no inhibida. La actividad fraccional se graficó contra la concentración de FFR-CMK, y los puntos que fueron >90% o <10% de la actividad no inhibida se descartaron. Una línea luego se dibujaron a través de los puntos restantes para determinar la intercepción x, que representa la concentración de proteasa activa en la solución. El valor de ensayos múltiples se midió y promedió y la desviación estándar se determinó.

Ejemplo 4

Determinación de la actividad catalítica de FYIIa para su sustrato, Factor X

La actividad catalítica de las variantes FVIIa para su sustrato, Factor X (FX), se evaluó indirectamente en un ensayo fluorogénico al evaluar la actividad de FXa, generado sobre la activación por FVIIa, en el sustrato sintético Spectrafluor FXa.

A. Actividad catalítica dependiente de TF de FVIIa tipo silvestre para su sustrato, Factor X

La actividad catalítica dependiente de TF de FVIIa tipo silvestre se evaluó en un ensayo fluorogénico en el cual una forma lipidada de factor de tejido perificado (TF) se incluyó para proporcionar actividad óptima de FVHa. La actividad de enzima de FXa para Spectrafluor FXa (CH_3SO_2-D-CHA-Gly-ATg-AMC.AcOH) se determinó al medir el incrementó en absorbancia del fluoroforo libre generado, AMC (7-amino-4-metilcoumarina), como una función de tiempo.

Brevemente, el polipéptido FVIIa tipo silvestre se diluyó

368

inicialmente a 0.5 µM en solución amortiguadora de ensayo 1 x (100 mM Tris pH 8.4, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 5 mM, y BSA 0.01%), entonces se diluyó además a 0.1 nM en solución amortiguadora de ensayo. La longitud completa lipidada TF (Innovin; Dade Behring) se reconstituyó en agua 20 mL para hacer una solución 3 nM y diluyó a 0.2 nM en solución amortiguadora de ensayo 1 x. Cuatrocientos µl de FVIIa 0.1 nM se mezcló con 400 µl TF 0.2 nM e incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La solución se diluyó además por dos, diluciones 2 veces en solución amortiguadora de ensayo 1 x que contiene TF 0.2 nM para obtener un total de tres diluciones FVIIa de 0.05 nM, 0.025 nM, o FVIIa 0.0125 nM cada uno que contiene TF 0.2 nM (soluciones FVIIa/TF).

El sustrato, Factor X (FX; American Diagnostica; 80 µg) se reconstituyó en agua destilada 135.6 µl para dar una solución de reserva 10 µM y almacenó en alicuotas a -80°C. En alícuotas no se congelaron y descongelaron más de una vez. La solución de reserva FX se diluyó a 800 nM en solución amortiguadora de ensayo directo, luego se diluyó en serie 2 veces para obtener soluciones FX que varían desde 800 nM hasta 50 nM.

El Spectrofluor Xa (American Diagnostica; 10 µmoles) se reconstituyó en agua destilada a 5 mM y almacenó a 4°C. A una placa de ensayo de la mitad de área negra de 96 pozos (Costar), 5 µl Spectrofluor Xa (American Diagnostica) se agregó a cada pozo. Entonces, 25 µl de la solución FX se agregó a cada pozo. A la última fila de pozos de la placa, un control negativo en el cual no se agregó FX también se incluyó en el ensayo. Por duplicado, las tres concentraciones de las soluciones TF/FVIIa

369

se agregaron en 20 µl a pozos de columnas respectivas de la placa de modo que cada dilución TF/FVIIa se probó contra cada dilución FX, con un conjunto de columnas que no contiene TF/FVIIa agregado (esto es, solo FX). Las placas se mezclaron al agitar. La fluorescencia se midió durante un plazo con un espectrofluorómetro establecido para leer cada 30 segundos durante 1 hora a 37°C (Ex: 380 nm, EM: 450 nm, De corte: 435 nm), y el tiempo se reportó en unidades de tiempo al cuadrado. Después del ensayo, una curva estándar de fluorescencia AMC en el mismo lector de placa se generó para cubrir de unidades de fluorescencia a sustrato uM liberado en el ensayo. Un AMC 1 mM en DMSO (Invitrogen) se diluyó a 0.02 mM en solución amortiguadora de ensayo 1x. Seis, diluciones en serie dos veces del AMC se hicieron que varían desde 20 nM hasta 0.625 nM en solución amortiguadora de ensayo 1 x. La fluorescencia del AMC se midió usando las mismas condiciones de ensayo como se describió anteriormente y una gráfica de fluorescencia contra concentración de AMC se trazó. La pendiente de la línea se calculó, lo cual sirvió como el factor de conversión para RFU a µM en cálculos siguientes.

Las constantes cinéticas para activación FVIIa de FX se calcularon al realizar análisis de regresión lineal en el inverso de la concentración sustrato contra el inverso de la velocidad de escisión de sustrato (en unidades de segundos^2), con $V_{max;\ FVIIa}$ calculado como el inverso de la intercepción y, $K_{m,\ FVIIa}$ como la pendiente en la intercepción y, y $V_{max}/ K_{m;\ FVIIa}$ como el inverso de la pendiente. El valor kC_{at} se derivó luego usando la ecuación;

$k_{cat}/K_{m,\ FVIIa} = V_{max}/K_{m,\ FVIIa}$ x 1/(0.5 x k_2 x [FVIIa en µM] x (RFU/µM factor de conversión))

donde; $k_2 = ([S] \times k_{cat,\ FXa})/(K_{m,\ FXa} + [S])$, donde $k_{cat,\ FXa}$ y $K_{m,\ FXa}$ son las constantes para escisión de FXa de EspectrofluorXa determinado experimentalmente usando estándares FXa como $k_{cat,\ FXa}$ = 117 seg^{-1}, y $K_{m,\ FXa}$ = 164 µM.

Usando las condiciones de ensayo anteriores, la constante cinética k2 se determinó para ser 88.1 seg^{-1}.

El K_m y k_{cat} para cada una de las variantes FVIIa se determinó para evaluar la actividad catalítica, k_{cat}/K_m ($M^{-1}seg^{-1}$) de cada uno para su sustrato, FX (Tabla 14). La proteasa FVIIa tipo silvestre se evaluó y se encontró para exhibir una actividad de 1.8 x 10^7 M^{-1} seg^{-1}. La activación del Factor VIIa de Factor X, como se midió por Krishnaswamy, et al. (J. Biol. Chem. (1998) 273:8 4378-86) es 2.9 X 10^7 $M^{-1}seg^{-1}$.

B. Análisis de la actividad catalítica de variantes FVIIa para el sustrato, Factor X

La actividad catalítica de las variantes FVIIa para el sustrato, Factor X (FX), se evaluó indirectamente en dos tipos de ensayos cromogénicos al evaluar la actividad de FXa, generado sobre la activación por FVIIa, en el sustrato sintético Spectrafluor FXa. Los dos ensayos se realizaron ya sea en la presencia o la ausencia de factor de tejido lipidado, para evaluar tanto la actividad dependiente TF como la independiente TF. Las variantes FVII se expresaron, purificaron y activaron a FVIIa como se describió anteriormente en los Ejemplos 1 y 2. Aunque la mayoría de las variantes FVII se expresaron solamente en células Freestyle™ 293-F, también

algunas se expresaron en células BHK-21.

Factor de tejido lipidado-ensayo indirecto dependiente

La actividad catalítica de las variantes FVIIa en la presencia de factor de tejido se evaluó usando el ensayo descrito en la sección A del Ejemplo 4, anterior, con menores modificaciones. Tal modificación fue el uso de una protease de sustrato de Factor X que se ha tratado con ERG-CMK y FFR-CMK para reducir la actividad de fondo (Molecular Innovations). Dos tipos de análisis de datos se realizaron usando dos ensayos separados; un ensayo de análisis de rango lineal y un ensayo de análisis de rango hiperbólico. El ensayo de análisis de rango lineal usa un rango de concentraciones de Factor X entre 0 y 150 nM para asegurar medición exacta de las constantes cinéticas en el rango lineal de la curva de dosis. En contraste, el ensayo de análisis de rango hiperbólico usa un rango de concentraciones de Factor X entre 0 y 1.44 µM para asegurar medición exacta de las constantes cinéticas con una curva de dosis (hiperbólica) de saturación.

El ensayo indirecto de factor de tejido lipidado con análisis de datos de rango lineal se realizó esencialmente como se describió en la sección A del Ejemplo 4, anterior, con las siguientes modificaciones. La variante FVIIa/soluciones TF se prepararon como soluciones FVIIa 0.1 nM/TF 0.4 nM e incubaron durante 30 minutos antes de que se diluya dos veces en TF 0.4 nM abajo a una solución que contiene 1.5625 pM FVIIa/TF 0.4 nM. Veinticinco µL de la solución FVIIa/TF se mezcló con 25 µL de una solución de sustrato que contenía 1.0 mM Spectrofluor FXa (American Diagnostica) y uno de 300 nM, 200 nM, 133.3 nM, 88.9 nM, 59.3, 39.5 nM, 36.3 nM o 0 nM de Factor X (Molecular Innovations).

Así, las concentraciones finales para el ensayo fueron FVIIa 0.8 pM, TF 0.2 nM, 0.5 mM Spectrofluor FXa y 150 nM, 100 nM, 66.7 nM, 44.4 nM, 29.6 nM, 19.8 nM, 13.2 nM o 0 nM de Factor X (Molecular Innovations) en 50 µL/pozo. La curva estándar AMC, que sirve como el factor de conversión para RFU hasta µM en cálculos posteriores, se amplió para incluir un rango de dosis que cubrió desde 0 µM hasta 100 µM AMC.

El ensayo indirecto de factor de tejido lipidado con análisis de datos de rango hiperbólico se realizó esencialmente como se describió en la sección A del Ejemplo 4, arriba, con las siguientes modificaciones. La variante FVIIa/soluciones TF se prepararon como soluciones FVIIa 0.1 nM/TF 0.4 nM e incubaron durante 30 minutos antes de que se diluya dos veces en TF 0.4 nM de hasta 1.5625 pM (o 0.78 pM para proteasas esperadas para tener actividad alta) FVIIa/TF 0.4 nM. Veinticinco µL de la solución FVIIa/TF se mezcló con 25 µL de una solución de sustrato que contenía 1.0 mM Spectrofluor FXa (American Diagnostica) y uno de 1440 nM, 720 nM, 360 nM, 180 nM, 90 nM, 45 nM, 22.5 nM o 0 nM de Factor X (Molecular Innovations). Así, las concentraciones finales para el ensayo fueron 0.8 (o 0.39) pM FVIIa, 0.2 nM TF, 0.5 mM Spectrofluor FXa y 7 nM, 720 nM, 360 nM, 180 nM, 90 nM, 45 nM, 22.5 nM, 11.25 nM o 0 nM de Factor X (Molecular Innovations) en 50 µL/pozo. Los parámetros k_{cat} y K_m se calcularon usando la ecuación hiperbólica Michaelis Menton de la forma $(V_{max}/(1+(K_m/x)))$. La curva estándar AMC, que sirve como el factor de conversión para RFU hasta µM en cálculos posteriores, se amplió para incluir un rango de dosis que cubrió desde 0 µM hasta 100 µM AMC.

Para determinar las constantes de velocidad cinética para la

373

activación de variante FVIIa o FVIIa de FX, datos en bruto colectados con la aplicación SoftMax Pro (Dispositivos moleculares) se exportaron como archivos .XML. Además análisis lineal o no lineal de datos se realizaron con XLfit4, un paquete de software para análisis estadístico y de ajuste de curva automático dentro del entorno de la hoja de cálculo Microsoft Excel (IDBS Software).

Para la recolección de datos usando ensayo de rango lineal, las constantes cinéticas k_{cat}/K_m ($M^{-1}seg^{-1}$) se calcularon directamente de la pendiente de análisis de regresión lineal de la concentración FX contra la velocidad de escisión de sustrato fluorogénico (en $\mu M/seg^2$) donde k_{cat}/K_m = pendiente/[FVIIa] $\times\theta.5\times k_2$. El factor de corrección k_2 se determinó para ser 45 usando el método descrito en la sección A del Ejemplo 4 y constantes cinéticas para escisión de FXa de Spectofluor FXa de $k_{cat,FXa}$ =- 56 seg^{-1} y $K_{m,\ FXa}$ = 126 nM, determinado experimentalmente con FX activado (FXa) que fue el sitio previamente activo titulado con AT-III/heparina. Excluyendo puntos de datos que resultan en valores R^2 menores que 0.98 aseguran la linealidad de los conjuntos de datos usados en la rutina de prueba.

Análisis de datos colectados usando el ensayo de rango hiperbólico se calcularon de análisis de regresión no lineal de la concentración FX contra la velocidad de escisión de sustrato fluorogénico (en $\mu M/seg^2$). Los parámetros individuales k_{cat} y K_m se calcularon como parámetros de ajuste usando la ecuación hiperbólica Michaelis Menton de la forma ($V_{max}/(1+(K_m/x))$) donde k_{cat} = V_{max}/[FVIIa] $\times0.5\times k_2$. La constante cinética, k_{cat}/K_M se calculó de los parámetros ajustados k_{cat} y K_m individuales.

Ensayo indirecto independiente de factor de tejido

La actividad catalítica de las variantes FVIIa en la presencia de factor de tejido se evaluó en un ensayo indirecto similar al descrito anteriormente excepto que el factor de tejido no se incluyó en el ensayo. Así, el ensayo para evaluar actividad independiente TF se realizó esencialmente como se describió anteriormente, con las siguientes modificaciones. Las soluciones de variante FVIIa se diluyeron a 50 nM (o 5 nM para variantes esperadas para tener alta actividad independiente TF). Veinticinco µL de cada solución FVIIa se mezcló con 25 µL de una solución de sustrato que contenía 1.0 mM Spectrofluor FXa (American Diagnostica) y uno de 1050 nM, 700 nM, 466.7 nM, 311.1 nM, 207.4 nM, 138.3 nM, 92.2 nM o 0 nM de Factor X (Molecular Innovations). Por lo tanto, las concentraciones finales para el ensayo fueron 25 nM FVIIa (o 2.5 nM para variantes de actividad alta), 0.5 mM Spectrofluor FXa y 525 nM, 350 nM, 233.3 nM, 155.6 nM, 103.7 nM, 69.1 nM, 46.1 nM o 0 nM de Factor X (Molecular Innovations) en 50 µL/pozo. Los análisis de datos se realizaron como se describió para el ensayo de rango lineal, anterior sin modificaciones.

La Tabla 14 proporciona la actividad catalítica de variantes FVIIa como se midió en un Ensayo Indirecto dependiente de TF usando polipéptidos FVIIa expresados de células 293-F y células BHK-21, y la actividad catalítica como se midió en un Ensayo Indirecto independiente de TF usando polipéptidos FVIIa expresados de células 293-F y/o células BHK-21. Los resultados se presentan como la constante cinética para actividad catalítica, k_{cat}/K_m ($M^{-1}seg^{-1}$), y también expresado como un

porcentaje de la actividad del FVIIa tipo silvestre, en donde la actividad es actividad catalítica, k_{cat}/K_m (M^{-1} seg^{-1}) de cada variante FVIIa para su sustrato, FX. El uso del análisis de datos de rango lineal o hiperbólico también se indica para los valores presentados en las tablas. No todas las variantes FVIIa se evaluaron en cada ensayo. Distintas variantes FVIIa exhibidas incrementan actividad catalítica comparada on la molécula FVIIa tipo silvestre. Por ejemplo, el polipéptido FVIIa que contiene justo la mutación Q286R (Q286R-FVIIa), tiene una actividad catalítica de entre 2 y 3 veces que de FVIIa tipo silvestre, y el polipéptido FVIIa que contiene las mutaciones Q286R y M298Q (Q286R/M298Q-FVIIa), tiene una actividad catalítica de sobre 3 veces que de FVIIa tipo silvestre.

Tabla 14. Actividad catalítica de variantes FVIIa

Ensayo Indirecto Dependiente de TF con polipéptidos FVIIa de células 293-F				
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Formato de Ensayo	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% en TN)
Q286N	Q143N	hiperbólico	4.88×10^7	100
Q286E	Q143E	hiperbólico	1.14×10^7	23
Q286D	Q143D	hiperbólico	6.04×10^6	12
Q286S	Q143S	hiperbólico	4.64×10^7	95
Q286T	Q143T	hiperbólico	2.44×10^7	50
Q286R	Q143R	lineal	1.11×10^8	323
Q286K	Q143K	hiperbólico	5.44×10^7	112

376

Q286A	Q143A	hiperbólico	8.55×10^7	175
Q286V	Q143V	hiperbólico	1.65×10^7	34
H216S	H76S	lineal	4.74×10^7	138
H216A	H76A	lineal	5.98×10^7	175
H216K	H76K	hiperbólico	6.51×10^7	133
H216R	H76R	hiperbólico	9.44×10^7	193
S222A	S82A	lineal	5.73×10^7	167
S222K	S82K	lineal	8.02×10^7	234
H257A	H117A	lineal	3.90×10^7	114
H257S	H117S	lineal	5.90×10^7	172
K161S	K24S	hiperbólico	5.99×10^7	123
K161A	K24A	lineal	4.22×10^7	123
K161V	K24V	hiperbólico	5.45×10^7	112
H373D	H224D	lineal	1.79×10^7	52
H373E	H224E	lineal	2.79×10^7	81
H373S	H224S	lineal	2.75×10^7	80
H373F	H224F	lineal	5.11×10^7	149
H373A	H224A	lineal	3.11×10^7	91
S52A	S[52]A	lineal	4.66×10^7	136
S60A	S[60]A	lineal	5.15×10^7	150
Q366D	Q217D	lineal	1.88×10^7	55
Q366E	Q217E	lineal	4.77×10^7	139
Q366N	Q217N	lineal	5.64×10^7	165
Q366T	Q217T	lineal	3.42×10^7	100
Q366S	Q217S	lineal	2.70×10^7	79
Q366V	Q217V	lineal	6.59×10^7	192
E394N/P395A/R396S	E245N/P246A/R247S	lineal	5.32×10^7	155
R202S	R62S	lineal	2.57×10^7	75
A292N/A294S	A150N/A152S	lineal	0	0
G318N	G170fN	lineal	5.50×10^7	161
A175S	A39S	lineal	3.32×10^7	97
K109N	K[109]N	lineal	5.97×10^7	174
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	lineal	5.27×10^7	154
T130N/E132S	T[130]N/E[132]S	lineal	6.35×10^7	185
A122N/G124S/ E394N/P395A/R396S	A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/R247S	lineal	4.88×10^7	142
V158T/L287T/M298K	V21T/L144T/M156K	lineal	4.50×10^6	13
V158D/L287T/M298K	V21D/L144T/M156K	lineal	4.48×10^6	13
S103S111delinsSFGRGDIRNV	S[103]S[111]delinsSFGRGDIRNV	lineal	4.83×10^7	141

P406insCSFGRGDIRNVC	P257insCSFGRGDIRNVC	lineal	6.16×10^7	180
P406insGGGSCSFGRGDIRNVC	P257insGGGSCSFGRGDIRNVC	lineal	7.47×10^7	218
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	lineal	5.96×10^7	174
S222A/ Gla intercambio de FIX	S82A/Gla intercambio de FIX	lineal	6.55×10^7	189
H257A/ Gla intercambio de FIX	H117A/Gla intercambio de FIX	lineal	6.45×10^7	186
S222A/H257A/Glaintercambio de FIX	S82A/H117A/intercambio de FIX	lineal	5.77×10^7	168
Q286R/ Gla Intercambio de FIX	Q143R/Gla intercambio de FIX	lineal	1.11×10^8	323
Q286R/H257A	Q143R/H117A	lineal	1.27×10^8	371
Q286R/S222A	Q143R/S82A	lineal	1.42×10^8	415
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	lineal	9.51×10^7	278
Q286R/S222A/Gla intercambio de FIX	Q143R/S82A/Glaintercambio de FIX	lineal	1.61×10^8	470
Q286R/H257A/Gla intercambio de FIX	Q143R/H117A/Glaintercambio de FIX	lineal	8.09×10^7	234
Q286R/S222A/H257A/Gla intercambio de FIX	Q143R/S82A/H117A/Gla intercambio de FIX	lineal	7.75×10^7	226
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q	lineal	3.93×10^7	115
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE	lineal	7.74×10^7	226
T239S	T99S	lineal	1.74×10^7	51
T239Q	T99Q	lineal	1.74×10^7	51
T239V	T99V	lineal	9.57×10^7	279
T239L	T99L	lineal	3.77×10^7	110
T239H	T99H	lineal	9.90×10^6	29
T239I	T99I	lineal	3.50×10^7	102
S222A/H257A/M298Q	S82A/H117A/M156Q	lineal	7.75×10^7	224
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	lineal	2.00×10^8	583
S222A/H257A	S82A/H117A	lineal	5.02×10^7	147
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	lineal	8.08×10^7	236
A175S/S222A/Q366V	A39S/S82A/Q217V	lineal	3.78×10^7	109
K109N/A175S	K[109]N/A39S	lineal	3.67×10^7	107
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V	lineal	1.27×10^8	369
Q286M	Q143M	lineal	5.25×10^7	153
Q286L	Q143L	lineal	2.02×10^7	59
Q286Y	Q143Y	lineal	1.61×10^7	47
Q366I	Q217I	lineal	9.37×10^7	274
Q366L	Q217L	lineal	6.87×10^7	201
Q366M	Q217M	lineal	6.61×10^7	193
S222V	S82V	lineal	6.04×10^7	176
S222D	S82D	lineal	5.34×10^7	156
S222N	S82N	lineal	6.82×10^7	199
S222E	S82E	lineal	5.48×10^7	160

328

H216A/H257A	H76A/H117A	lineal	6.62×10^7	193
H216A/S222A	H76A/S82A	lineal	5.46×10^7	159
H257S/Q286R	H117S/Q143R	lineal	3.93×10^7	115
H257S/Q366V	H117S/Q217V	lineal	6.71×10^7	194
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	lineal	1.58×10^8	457
S222A/H257A/Q286R/Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	lineal	1.86×10^8	538
Q366V/H373V	Q217V/H224V	lineal	1.84×10^7	53
Q366V/H373L	Q217V/H224L	lineal	3.07×10^7	89
Q286R/H373A	Q143R/H224A	lineal	5.89×10^7	172
S222A/H373A	S82A/H224A	lineal	3.64×10^7	106
Q286R/M298Q/K341D	Q143R/M156Q/K192D	lineal	1.18×10^7	34
Q286R/K341D	Q143R/K192D	lineal	1.11×10^7	32
Q286R/Q366D	Q143R/Q217D	lineal	1.53×10^7	45
Q286R/Q366N	Q143R/Q217N	lineal	5.42×10^7	158
Q286R/M298Q/Q366D	Q143R/M156Q/Q217D	lineal	1.91×10^7	56
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	lineal	1.04×10^8	305
Q286R/H373F	Q143R/H224F	lineal	9.08×10^7	265
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	lineal	1.51×10^8	440
M298Q/H373F	M156Q/H224F	lineal	8.49×10^7	248
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	lineal	2.92×10^7	85
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	lineal	2.98×10^7	87
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	lineal	2.79×10^7	81
M298Q	M156Q	lineal	1.4×10^8	409

Ensayo Indirecto Dependiente de TF con polipéptidos FVIIa de células BHK-21

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Formato de Ensayo	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% en TN)
P	P	lineal	5.42×10^7	100
Q286R	Q143R	lineal	1.01×10^8	187
H216A	H76A	lineal	5.98×10^7	110
S222A	S82A	lineal	6.42×10^7	118
H257A	H117A	lineal	4.96×10^7	91
H257S	H117S	lineal	7.65×10^7	141
H373F	H224F	lineal	4.82×10^7	89
S52A	S[52]A	lineal	3.50×10^7	65
S60A	S[60]A	lineal	3.22×10^7	59
Q366D	Q217D	lineal	9.80×10^6	18
Q366N	Q217N	lineal	3.44×10^7	63
Q366V	Q217V	lineal	1.86×10^8	342
G318N	G170fN	lineal	5.46×10^7	101

A175S	A39S	lineal	2.12×10^7	39
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	lineal	8.05×10^7	148
A51N	A[51]N	lineal	1.02×10^8	188
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A	lineal	1.05×10^8	193
P406insGGGSCSFGRGDIRNVC	P257insGGGSCSFGRGDIRNVC	lineal	9.54×10^7	176
S119N/L121S	S[119]N/L[121]S	lineal	5.75×10^7	106
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	lineal	8.76×10^7	161
Q286R/S222A	Q143R/S82A	lineal	1.24×10^8	229
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	lineal	1.06×10^8	196
Q286R/S222A/Gla Intercambio de FIX	Q143R/S82A/Gla intercambio FIX	lineal	8.52×10^7	157
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	lineal	1.85×10^8	341
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q	lineal	3.11×10^7	57
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE	lineal	9.18×10^7	169
P321K	P170iK	lineal	3.43×10^7	63
P321E	P170iE	lineal	5.59×10^7	103
P321Y	P170iY	lineal	4.48×10^7	83
P321S	P170iS	lineal	5.53×10^7	102
T239N	T99N	lineal	1.64×10^7	30
T239Q	T99Q	lineal	1.70×10^7	31
T239V	T99V	lineal	9.81×10^7	181
T239L	T99L	lineal	5.24×10^7	97
T239H	T99H	lineal	1.25×10^7	23
T239I	T99I	lineal	4.67×10^7	86
S222A/M298Q	S82A/M156Q	lineal	7.13×10^7	131
H257A/M298Q	H117A/M156Q	lineal	1.28×10^8	236
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	lineal	1.94×10^8	358
Q286R/M298Q/Gla Intercambio de FIX	Q143R/M156Q/Gla Intercambio de FIX	lineal	2.64×10^8	487
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V	lineal	7.92×10^7	146
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	lineal	7.63×10^7	141
K109N/A175S	K[109]N/A39S	lineal	2.45×10^7	45
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V	lineal	1.44×10^8	265
Q286R/M298Q/K341D	Q143R/M156Q/K192D	lineal	1.35×10^7	25
Q286R/H373F	Q143R/H224F	lineal	1.18×10^8	218
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	lineal	2.01×10^8	371
M298Q/H373F	M156Q/H224F	lineal	8.69×10^7	160
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	lineal	1.93×10^7	36
M298Q	M156Q	lineal	9.34×10^7	172
Ensayo Indirecto Independiente de TF				

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Células 293-F		Células BHK-21	
		k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% en TN)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% en TN)
TN	TN	$2.26x\ 10^1$	100	$1.58x\ 10^1$	100
Q286N	Q143N	$3.03x\ 10^1$	134		
Q286E	Q143E	4.80	21		
Q286D	Q143D	$3.50x\ 10^{-1}$	2		
Q286S	Q143S	$2.66x\ 10^1$	118		
Q286T	Q143T	$1.51x\ 10^1$	67		
Q286R	Q143R	$4.87x\ 10^1$	215	$4.08x\ 10^1$	259
Q286K	Q143K	$3.95x\ 10^1$	175		
Q286A	Q143A	$2.11x\ 10^1$	93		
Q286V	Q143V	2.35	10		
S222A	S82A	$7.36x\ 10^1$	326	$3.10x\ 10^1$	197
H257A	H117A	$2.02x\ 10^1$	89	$1.18x\ 10^1$	75
H257S	H117S	$1.75x\ 10^1$	77	$1.33x\ 10^1$	84
Q366D	Q217D	6.30	28	2.30	15
Q366E	Q217E	$2.38x\ 10^1$	105		
Q366N	Q217N	$2.26x\ 10^1$	100	$1.36x\ 10^1$	86
Q366T	Q217T	$2.48x\ 10^1$	110		
Q366S	Q217S	$1.02x\ 10^1$	45		
Q366V	Q217V	$2.90x\ 10^1$	128	$8.36x\ 10^1$	530
A51N	A[51]N			$2.07x\ 10^1$	91
V158T/L287T/M298K	V21T/L144T/M156K	4.65	21		
V158D/L287T/M298K	V21D/L144T/M156K	2.50	11		
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A			$1.68x\ 10^1$	106
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A			$1.43x\ 10^1$	91
Q286R/Gla Intercambio de FIX	Q143R/Gla Intercambio de FIX	$4.37x\ 10^1$	193		
Q286R/H257A	Q143R/H117A	$1.07x\ 10^1$	47		
Q286R/S222A	Q143R/S82A	$1.00x\ 10^2$	444	$3.18x\ 10^1$	202
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A			9.60x 10	61
Q286R/S222A/Gla Intercambio de FIX	Q143R/S82A/Gla Intercambio de FIX	$1.82x\ 10^2$	804	$3.63x\ 10^1$	230
Q286R/S222A/H257A/Gla Intercambio de FIX	Q143R/S82A/H117A/Gla Intercambio de FIX	$2.79x\ 10^1$	123		
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q			$3.02x\ 10^2$	1916
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q	$1.50x\ 10^2$	665	$3.65x\ 10^2$	2319
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE	$8.69x\ 10^1$	385	$2.29x\ 10^2$	1451
P321K	P170iK			$1.13x\ 10^1$	71
S222A/M298Q	S82A/M156Q			$7.85x\ 10^2$	4981

381

H257A/M298Q	H117A/M156Q			4.12×10^{1}	262
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	6.09×10^{2}	2695	1.90×10^{2}	1208
Q286R/M298Q/Gla Intercambio de FIX	Q143R/M156Q/Gla Intercambio de FIX			7.52×10^{2}	4775
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V			2.38×10^{1}	151
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	3.87×10^{1}	171	1.23×10^{1}	78
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V			3.21×10^{1}	204
Q286M	Q143M	1.07×10^{1}	47		
Q286L	Q143L	3.20	14		
Q286Y	Q143Y	9.50×10^{-1}	4		
Q366I	Q217I	6.29×10^{1}	278		
Q366L	Q217L	2.54×10^{1}	112		
Q366M	Q217M	4.05×10^{1}	179		
Q286R/K341D	Q143R/K192D	1.80	8		
Q286R/Q366D	Q143R/Q217D	1.00	4		
Q286R/Q366N	Q143R/Q217N	2.75	12		
Q286R/M298Q/Q366D	Q143R/M156Q/Q217D	6.80	30		
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	2.12×10^{1}	94		
Q286R/H373F	Q143R/H224F			2.20×10^{1}	139
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	2.16×10^{2}	957	3.17×10^{2}	2009
M298Q/H373F	M156Q/H224F			2.36×10^{2}	1499
M298Q	M156Q	4.59×10^{2}	2029	3.1×10^{2}	1969

En un conjunto adicional de experimentos, la actividad catalítica de polipéptidos FVIIa producidos en células BHK-21 se analizó usando los ensayos indirectos dependiente de TF e independiente de TF descritos anteriormente con menores modificaciones. Las distintas variantes se produjeron en células CHOX además de células BHK-21 o exclusivamente en células CHOX. Las variantes se evaluaron bajo condiciones idénticas independientemente de la línea celular usada. Para el ensayo catalítico dependiente de TF (usando análisis lineal), los polipéptidos FVIIa primero se titularon al sitio activo con p'-guanidinobenzoato de 4-metilumbelliferilo (MUGB) para determinar la concentración FVIIa, como se describió en el Ejemplo 12, abajo. Para maximizar el número de puntos de datos en el rango lineal, la concentración máxima de FX en el ensayo fue establecido a 25 nM (esto es, 0-25 nM en lugar de 0-150 nM). El FX

382

usado en el ensayo se activó (esto es, FXa) y tituló con fluoresceina-mono-p'-guanidinobenzoato (FMGB), como se describió en el Ejemplo 15, abajo. Las constantes cinéticas para escisión de sustrato Spectrafluor FXa se determinaron en este sitio activo titulado FXa y demostraron ser: K_m de 190.2 µM y un k_{cat} de 340 s^{-1}. La diferencia primaria que está en k_{cat} y sobre todo debido a las determinaciones de sitio activo mejoradas. Estos parámetros dan un valor de factor de corrección k_Σ revisado de 246.4 que se usa en el análisis líneal para determinar la actividad catalítica de los polipéptidos FVIIa en la presencia de TF.

Para el ensayo catalítico independiente de TF, los polipéptidos FVIIa primero se titularon al sitio activo con p'-guanidinobenzoato de 4-metilumbelliferilo (MUGB) para determinar la concentración FVIIa, como se describió en el Ejemplo 12, abajo. El FX usado en el ensayo se activó (esto es, FXa) y tituló con fluoresceina-mono-p'-guanidinobenzoato (FMGB), como se describió en el Ejemplo 15. Las constantes cinéticas para escisión de sustrato Spectrafluor FXa se determinaron en este sitio activo titulado FXa y demostraron ser: K_m de 190.2 µM y un k_{cat} de 340 s^{-1}. Estos parámetros dan un valor de factor de corrección k_2 revisado de 246.4 que se usa en el análisis para determinar la actividad catalítica de los polipéptidos FVIIa en la ausencia de TF.

La Tabla 15 establece la actividad catalítica de cada uno de los polipéptidos de variante FVIIa probados. Los resultados se presentan como la constante cinética para actividad catalítica, k_{cat}/K_m, (M^{-1} seg^{-1}), y también se expresan como un porcentaje de la actividad del FVIIa tipo silvestre, en donde la actividad es actividad catalítica, k_{cat}/K_m (M^{-1} seg^{-1}) de cada variante FVIIa para su sustrato, FX. La desviación estándar (SD), coeficiente de variación (como un porcentaje; %CV) y el número de ensayos realizados (n) también se proporcionan. Algunas de las variantes

383

desplegadas claramente incrementan la actividad catalítica comparada con el polipéptido FVII tipo silvestre. Por ejemplo, la variante Gla Intercambio FIX/Q286R/M298Q exhibe una actividad catalítica dependiente de TF sobre 6 veces que del polipéptido FVII tipo silvestre. La actividad catalítica incrementada de las variantes FVIIa fue más pronunciada en el ensayo independiente TF. Por ejemplo, las variantes Gla Intercambio FIX/Q366V tuvó sobre 9 veces más actividad catalítica que FVIIa tipo silvestre, las variantes Gla Intercambio FIX/Q286R/M298Q, {Gla Intercambio FIX/E40LJ/Q286R/M298Q, {Gla Intercambio FIX/K43I}/Q286R/M298Q, y {Gla Intercambio FIX/Q44S}/Q286R/M298Q tuvieron sobre 70-80 veces más actividad catalítica que FVIIa tipo silvestre, y la variante S52A/S60A/V158D/E296V/M1298Q tuvo sobre 220 veces más actividad catalítica que FVIIa tipo silvestre.

Tabla 15. Actividad Catalítica de variantes FVIIa

Ensayo Indirecto Dependiente de TF						
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en TNP)	n
TN (NovoSeven®)	TN (NovoSeven®)	3.98E+07	1.02E+07	26%	106%	30
TN (NovoSeven-RT®)	TN (NovoSeven-RT®)	3.48E+07	8.33E+06	24%	93%	10
TN	TN	3.75E+07	5.44E+06	15%	100%	13
TN †	TN †	3.76E+07	7.09E+06	19%	100%	10
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	4.65E+07	1.09E+07	23%	124%	5
Gla Intercambio de FIX	Gla Intercambio de FIX	5.38E+07	9.08E+05	2%	144%	2
K109N	K[109]N	5.54E+07	8.57E+06	15%	148%	2
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	3.87E+07	4.96E+06	13%	103%	2
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A	3.56E+07	4.63E+06	13%	95%	2
M298Q	M156Q	6.76E+07	7.38E+06	11%	180%	6
M298Q †	M156Q †	7.46E+07	9.42E+06	13%	198%	4
T128N/P129A/M298Q †	T[128]N/P[129]A/M156Q †	6.29E+07	1.28E+07	20%	167%	4
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	1.81E+08	4.43E+07	25%	482%	8
V158D/E296V/M298Q †	V21D/E154V/M156Q †	1.65E+08	4.08E+07	25%	441%	10
T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q	T[128]N/P[129]A/V21D/E154V/M156Q	2.01E+08	1.54E+07	8%	537%	4
S52A/S60A/V158D/E296V/M1298Q	S[52]A/S[60]A/V21D/E154/M156Q	2.00E+08	4.31E+05	0%	532%	2
Q286R	Q143R	8.06E+07	1.43E+07	18%	215%	5
T128N/P129A/Q286R	T[128]N/P[129]A/Q143R	8.45E+07	1.90E+07	22%	226%	6
T128N/P129A/Q286R †	T[128]N/P[129]A/Q143R †	6.20E+07			165%	1
S52A/S60A/Q286R	S[52]A/S[60]A/Q143R	4.10E+07	6.71E+06	16%	109%	4
S222A	S82A	4.07E+07	1.17E+07	29%	109%	4
T128N/P129A/S222A	T[128]N/P[129]A/S82A	6.25E+07	6.78E+06	11%	167%	4
S52A/S60A/S222A	S[52]A/S[60]A/S82A	3.91E+07	8.75E+06	22%	104%	3
H257S	H117S	1.18E+08	2.02E+07	17%	316%	2
H373F	H224F	5.58E+07	2.05E+07	37%	149%	2
Q366V	Q217V	5.48E+07	2.69E+06	5%	146%	2
Gla Intercambio de FIX/Q366V	Gla Intercambio de FIX/Q217V	9.11E+07	2.50E+07	27%	243%	3
A175S	A39S	2.11E+07	6.10E+06	29%	56%	3
K109N/A175S	K[109]N/A39S	1.74E+07	4.29E+06	25%	46%	5
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	1.73E+07	1.28E+06	7%	46%	2
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	8.59E+06	1.82E+06	21%	23%	2
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	1.05E+07	1.12E+06	11%	28%	2

385

Q286R/H257A	Q143R/H117A	9.91E+07	1.74E+07	18%	264%	2
Q286R/H257A †	Q143R/H117A †	3.08E+07	1.52E+07	49%	82%	4
Q286R/S222A	Q143R/S82A	1.11E+08	3.21E+07	29%	296%	4
Gla Intercambio de FIX/ T128N/P129A/ S222A/Q286R	Gla Intercambio de FIX/ T[128]N/P[129]A/ S82A/Q143R	1.47E+08	2.53E+07	17%	393%	3
Gla Intercambio de FIX/ T128N/P129A/ S222A/Q286R †	Gla Intercambio de FIX/ T[128]N/P[129]A/ S82A/Q143R †	1.43E+08	1.63E+07	11%	379%	2
Gla Intercambio de FIX/ S52A/S60A/S222A/Q286R	Gla Intercambio de FIX/ S[52]A/S[60]A/S82A/Q143R	7.24E+07	2.36E+06	3%	193%	2
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	6.98E+07	1.64E+07	23%	186%	3
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	1.66E+08	3.86E+07	23%	442%	14
Q286R/M298Q †	Q143R/M156Q †	1.34E+08	2.37E+07	18%	356%	15
Q286R/M298Q §	Q143R/M156Q §	1.54E+08	3.86E+07	25%	408%	6
Gla Intercambio de FIX/ Q286R/M298Q	Gla Intercambio de FIX/ Q143R/M156Q	2.55E+08	6.16E+07	24%	680%	6
Gla Intercambio de FIX/ Q286R/M298Q †	Gla Intercambio de FIX/ Q143R/M156Q †	2.30E+08	5.10E+07	22%	613%	4
T128N/P129A/Q286R/ M298Q	T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q	1.86E+08	2.64E+07	14%	497%	6
T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q †	1.50E+08	4.16E+07	28%	398%	4
Gla Intercambio de FIX /T128N/P129A/Q286R/ M298Q	Gla Intercambio de FIX /T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q	2.11E+08	4.41E+07	21%	562%	3
Gla Intercambio de FIX /T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	Gla Intercambio de FIX /T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q †	1.99E+08	6.79E+07	34%	529%	5
{Gla Intercambio de FIX/E40L}/ Q286R/M298Q	{Gla Intercambio de FIX/E40L}/ Q143R/M156Q	2.08E+08	4.39E+07	21%	556%	4
{Gla Intercambio de FIX/K[431}/ Q286R/M298Q	{Gla Intercambio de FIX/K[43]I}/ Q143R/M156Q	2.73E+08	5.21E+07	19%	727%	5
{Gla Intercambio de FIX/K[43I}/ Q286R/M298Q †	{Gla Intercambio de FIX/K[43]I}/ Q143R/M156Q †	2.91E+08	4.30E+07	15%	774%	5
{Gla Intercambio de FIX/Q44S}/ Q286R/M298Q	{Gla Intercambio de FIX/Q[44]S}/ Q143R/M156Q	1.98E+08	2.75E+07	14%	529%	3
{Gla Intercambio de FIX/M19K}/ Q286R/M298Q	{Gla Intercambio de FIX/M[19]K}/ Q143R/M156Q	1.41E+08	5.22E+06	4%	375%	2
S52A/S60A/ Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156 Q	1.25E+08	1.14E+07	9%	333%	4

386

Gla Intercambio de FIX/S52A/S60A/ Q286R/M298Q †	Gla Intercambio de FIX /S[52]A/S[60]A/Q143R/M15 6Q †	1.80E+08	1.81E+07	10%	480%	3
{Gla Intercambio de FIX/M19K/E40L/K43I/Q44 S}/ Q286R/M298Q	{Gla Intercambio de FIX/M[19]K/E[40]L/K[43]I/ Q[44]}/ Q286R/M298Q	1.21E+08	7.07E+06	6%	322%	2
{Gla Intercambio de FIX/K43I}/T128N/P129A/ Q286R/M298Q †	{Gla Intercambio de FIX/K[43]I}/T128N/P129A/ Q143R/M156Q †	2.71E+08	6.41E+07	24%	720%	5
T239V	T99V	4.64E+07	8.38E+06	18%	124%	2
T239I	T99I	2.62E+07	6.51E+06	25%	70%	2
H257A/ M298Q	H117A/Q143R/M156Q	1.67E+07	4.27E+06	26%	45%	5
S222A/H257A/Q286R/ M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	1.65E+08	1.76E+07	11%	440%	4
T128N/P129A/S222A/ H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/H11 7A/Q143R/M156Q	1.55E+08	5.77E+07	37%	414%	9
T128N/P129A/S222A/ H257A/Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/S82A/H11 7A/Q143R/M156Q †	1.73E+08	1.41E+07	8%	461%	2
S52A/S60A/S222A/H257A/ Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H117A /Q143R/M156Q	2.49E+08	8.78E+06	4%	665%	3
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	7.10E+07	3.16E+07	44%	189%	11
S222A/H257A/Q286R/ Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	1.00E+08	1.03E+07	10%	268%	4
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	1.17E+08	3.05E+07	26%	312%	7
T128N/P129A/Q286R/M29 8Q/Q366N †	T[129]N/P[129]A/Q143R/M1 56Q/Q217N †	1.42E+08	4.17E+07	29%	377%	3
{Gla Intercambio de FIX/K43I}/Q286R/M298Q/ Q366N †	{Gla Intercambio de FIX/K43I}/Q143R/M156Q/Q 217N †	1.69E+08	3.89E+07	23%	450%	5
{Gla Intercambio de FIX/K43I}/T128N/P129A/ Q286R/M298Q/Q366N †	{Gla Intercambio de FIX/K43I}/T[128]N/P[129]A /Q143R/M156Q/Q217N †	2.52E+08	1.36E+07	5%	669%	2
Q286R/H373F	Q143R/H224F	9.01E+07	7.73E+06	9%	240%	2
T128N/P129A/ Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H2 24F	6.91E+07	2.15E+07	31%	184%	12
S52A/S60A/ Q286R/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/H224 F	9.44E+07	1.43E+07	15%	252%	3
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	1.36E+08	1.92E+07	14%	364%	5
T128N/P129A/Q286R/M29 8Q/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M1 56Q/H224F	1.33E+08	4.77E+07	36%	354%	17
S52A/S60A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156	1.77E+08	3.63E+07	21%	472%	3

387

/H373F	Q/H224F					
M298Q/H373F	M156Q/H224F	7.21E+07	1.76E+07	24%	192%	4
T128N/P129A/M298Q/H373F †	T[128]N/P[129]A/M156Q/H224F †	6.07E+07	1.29E+07	21%	161%	2
V158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	1.49E+08	3.59E+07	24%	397%	11
S222A/T239V	S82A/T99V	7.49E+07	2.57E+06	3%	200%	3
Gla Intercambio de FIX /S222A/T239V/Q286R	Gla Intercambio de FIX /S82A/T99V/Q143R	2.03E+08	3.16E+07	16%	541%	3
Gla Intercambio de FIX /S222A/T239V/Q286R †	Gla Intercambio de FIX /S82A/T99V/Q143R †	9.94E+07	1.83E+07	18%	264%	3
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	1.72E+08	4.92E+07	29%	459%	5
Gla Intercambio de FIX T239V/Q286R/M298Q	Gla Intercambio de FIX T99V/Q143R/M156Q	2.53E+08	4.78E+07	19%	675%	3
Gla Intercambio de FIX T239V/Q286R/M298Q †	Gla Intercambio de FIX T99V/Q143R/M156Q †	1.79E+08	3.81E+07	21%	477%	4
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q †	1.04E+08	2.43E+07	23%	276%	4
S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/ M156Q	2.14E+08	4.48E+07	21%	571%	5
T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q †	1.21E+08	5.58E+06	5%	323%	3
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	1.06E+08	1.34E+07	13%	283%	2
T239V/Q286R/M298Q/H373F	T99V/Q143R/M156Q/H224F	1.70E+08	1.13E+07	7%	454%	2
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q/H373F †	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q/H224F †	2.36E+08	2.77E+07	12%	627%	3
V158D/T239I/E296V/M298Q	V21D/T99I/E154V/M156Q	1.45E+08	1.18E+07	8%	387%	4
T239I/Q286R	T99I/Q143R	5.79E+07	1.39E+07	24%	155%	3
S222A/T239I	S82A/T99I	3.05E+07	9.26E+06	30%	81%	4
Gla Intercambio de FIX/S222A/T239I/Q286R	Gla Intercambio de FIX /S82A/T99I/Q143R	6.77E+07	4.44E+06	7%	181%	2
T239I/Q286R/M298Q	T99I/Q143R/M156Q	1.13E+08	3.68E+06	3%	301%	2
Gla Intercambio de FIX/ T239I/Q286R/M298Q	Gla Intercambio de FIX /T99I/Q143R/M156Q	1.25E+08	2.13E+07	17%	334%	2
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M156Q †	8.17E+07	8.17E+06	10%	217%	3
S222A/T239I/H257A/Q286	S82A/T99I/H117A/Q143R/M	1.14E+08	2.22E+07	19%	304%	3

388

R/M298Q	156Q					
T239I/Q286R/H373F	T99I/Q143R/H224F	6.18E+07	9.27E+06	15%	165%	3
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	2.22E+08	1.39E+07	6%	591%	2
V158D/T239V/E296V/M298Q †	V21D/T99V/E154V/M156Q †	1.65E+08	2.12E+06	1%	438%	2
T239V/Q286R	T99V/Q143R	8.84E+07	7.16E+05	1%	236%	2
T239I/Q286R/M298Q/H237F	T99I/Q143R/M156Q/H224F	1.08E+08	2.32E+07	21%	289%	7
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q/ H237F †	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M156Q/H224F †	1.30E+08	2.51E+07	19%	345%	5
H257S/Q286R/M298Q	H117S/Q143R/M156Q	1.40E+08	8.97E+06	6%	372%	4
Gla Intercambio de FIX /Q286R/S222A/H257S	Gla Intercambio de FIX /Q143R/S82A/H117S	8.53E+07	1.66E+07	20%	227%	3
S222A/H257S/Q286R/M298Q	S82A/H117S/Q143R/M156Q	1.58E+08	1.76E+07	11%	420%	2
H257S/Q286R/M298Q/H373F	H117S/Q143R/M156Q/H224F	1.52E+08	3.35E+07	22%	407%	7
S222A/Q286R/M298Q/H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	1.48E+08	2.23E+06	2%	395%	2
Gla Intercambio de FIX/S222A/Q286R/M298Q/H373F	Gla Intercambio de FIX S82A/Q143R/M156Q/H224F	2.84E+08	4.85E+07	17%	758%	3
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	1.29E+08	1.86E+07	14%	343%	3
Gla Intercambio de FIX/S222A/Q286R/M298Q	Gla Intercambio de FIX S82A/Q143R/M156Q	2.10E+08	4.28E+07	20%	559%	5
T128N/P129A/A175S/Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/Q217V	3.38E+07	3.06E+06	9%	90%	2
A122N/G124S/A175S/Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/Q217V	3.02E+07	7.05E+06	23%	80%	5
T128N/P129A/A175S/S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A	1.72E+07	3.18E+06	18%	46%	3
A122N/G124S/A175S/S222A	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A	2.08E+07	5.05E+06	24%	56%	5
T128N/P129A/A175S/Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R	3.33E+07	1.46E+06	4%	89%	3
A122N/G124S/A175S/Q286R	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R	4.11E+07	5.27E+06	13%	110%	5
Gla Intercambio de FIX/S222A/Q286R/H373F	Gla Intercambio de FIX/S82A/Q143R/H224F	1.22E+08	3.17E+07	26%	327%	8
V158D/E296V/M298Q/H373F	V21D/E154V/M156Q/H224F	1.51E+08	8.39E+06	6%	402%	3

385

H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	1.13E+08	1.55E+07	14%	301%	3
Gla Intercambio de FIX/ T128N/P129A/A175S/ S222A/Q286R	Gla Intercambio de FIX/ T[128]N/P[129]A/A39S/S82 A/Q143R	3.88E+07	2.74E+06	7%	104%	3
Gla Intercambio de FIX/ A122N/G124S/A175S/ S222A/Q286R	Gla Intercambio de FIX/ A[122]N/G[124]S/A39S/S82 A/Q143R	4.13E+07	8.99E+06	22%	110%	6
T128N/P129A/A175S/ Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/Q14 3R/M156Q	7.21E+07	1.14E+07	16%	192%	3
A122N/G124S/A175S/ Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/Q14 3R/M156Q	7.43E+07	1.10E+07	15%	198%	3
T128N/P129A/A175S/ S222A/H257A/Q286R/ M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82 A/H117A/Q143R/M156Q	6.89E+07	3.36E+06	5%	184%	3
A122N/G124S/A175S/ S222A/H257A/Q286R/ M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/S82 A/H117A/Q143R/M156Q	8.40E+07	5.72E+06	7%	224%	3
T128N/P129A/A175S/ Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/A39S/Q14 3R/M156Q/H224F	5.72E+07	3.36E+06	6%	153%	3
A122N/G124S/A175S/ Q286R/M298Q/H373F	A[122]N/G[124]S/A39S/Q14 3R/M156Q/H224F	8.39E+07	9.99E+06	12%	224%	3
V158D/Q286R/E296V/M29 8Q/H373F	V21D/Q143R/E154V/M156 Q/H224F	2.39E+08	3.82E+07	16%	638%	5
M298Q/Q366N/H373F †	M156Q/Q217N/H224F †	7.05E+07	1.78E+07	25%	188%	3
T239V/M298Q/H373F †	T99V/M156Q/H224F †	4.43E+07	1.10E+07	25%	118%	3
T239I/M298Q/H373F †	T99I/M156Q/H224F †	3.47E+07	4.57E+06	13%	92%	3
T128N/P129A/Q286R/M29 8Q/Q366N/H373F †	T[128]N/P[129]A/Q143R/M1 56Q/Q217N/H224F †	1.33E+08	1.81E+07	14%	355%	2
T239V/Q286R/M298Q/Q36 6N †	T99V/Q143R/M156Q/Q217 N †	1.85E+08	5.96E+07	32%	491%	4
T239I/Q286R/M298Q/Q36 6N †	T99I/Q143R/M156Q/Q217N †	7.40E+07	1.40E+07	19%	197%	4

Ensayo Indirecto Dependiente de TF						
Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en TN)	n
TN (NovoSeven®)	TN (NovoSeven®)	9.8	3.0	30%	88%	14
TN (NovoSeven-RT®)	TN (NovoSeven-RT®)	12.4	4.3	35%	112%	12
TN	TN	11.1	2.7	25%	100%	5
TN †	TN †	6.9	2.2	31%	100%	7

000360

T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	17.0	5.2	31%	153%	3
Gla Intercambio de FIX/	Gla Intercambio de FIX/	41.3	3.0	7%	373%	2
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	3.4	0.6	16%	31%	2
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A	3.8			34%	1
M298Q †	M156Q †	69.9	49.4	71%	1013%	3
T128N/P129A/M156Q †	T[128]N/P[129]A/M156Q †	90.8	70.8	78%	1316%	5
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	1221.7	307.0	25%	11025%	4
V158D/E296V/M298Q †	V21D/E154V/M156Q †	984.5	308.4	31%	14265%	2
T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q	T[128]N/P[129]A/V21D/E154V/M156Q	1375.8	140.3	10%	12415%	3
S52A/S60A/V158D/E296V/M1298Q	S[52]A/S[60]A/V21D/E154V/M156Q	1760.1	575.0	33%	15883%	3
Q286R	Q143R	10.3	0.7	7%	93%	3
T128N/P129A/Q286R	T[128]N/P[129]A/Q143R	8.7	4.3	50%	78%	5
T128N/P129A/Q286R †	T[128]N/P[129]A/Q143R †	10.5	5.6	53%	152%	6
S52A/S60A/S82A	S[52]A/S[60]A/S82A	10.2	4.7	47%	92%	3
T128N/P129A/S222A	T[128]N/P[129]A/S82A	4.8			43%	1
S52A/S60A/S222A	S[52]A/S[60]A/S82A	19.6			177%	1
H257S	H117S	3.1	1.1	35%	28%	7
Q366V	Q217V	4.3	0.6	14%	39%	2
Gla Intercambio de FIX/Q366V	Gla Intercambio de FIX/Q217V	90.0	17.7	20%	812%	2
Q286R/H257A	Q143R/H117A	4.3	2.1	49%	39%	3
Q286R/H257A †	Q143R/H117A †	2.5	0.0	0%	36%	2
Gla Intercambio de FIX/ T128N/P129A/ S222A/Q286R	Gla Intercambio de FIX/ T[128]N/P[129]A/ S82A/Q143R	15.5	2.9	18%	140%	4
Gla Intercambio de FIX/ T128N/P129A/ S222A/Q286R †	Gla Intercambio de FIX/ T[128]N/P[129]A/ S82A/Q143R †	21.3	6.5	31%	309%	5
Gla Intercambio de FIX/ S52A/S60A/S222A/Q286R	Gla Intercambio de FIX/ S[52]A/S[60]A/S82A/Q143R	2.9			26%	1
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	21.3	6.5	31%	193%	5
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	79.9	18.9	24%	721%	5
Q286R/M298Q †	Q143R/M156Q †	162.4	79.9	49%	2353%	12
Q286R/M298Q §	Q143R/M156Q §	135.1	7.3	5%	1957%	2
Gla Intercambio de FIX/ Q286R/M298Q	Gla Intercambio de FIX/ Q143R/M156Q	672.7	79.1	12%	6070%	4
Gla Intercambio de FIX/ Q286R/M298Q †	Gla Intercambio de FIX/ Q143R/M156Q †	678.2	249.0	37%	9826%	11
T128N/P129A/Q286R/	T[128]N/P[129]A/Q143R/	81.6	13.4	16%	736%	4

391

M298Q	M156Q					
T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q †	212.5	135.4	64%	3079%	10
Gla Intercambio de FIX /T128N/P129A/Q286R/ M298Q	Gla Intercambio de FIX /T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q	83.8	35.3	42%	756%	6
Gla Intercambio de FIX /T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	Gla Intercambio de FIX /T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q †	751.9	305.3	41%	10895%	6
{Gla Intercambio de FIX/E40L}/ Q286R/M298Q	{Gla Intercambio de FIX/E[40]L}/ Q143R/M156Q	814.1	89.0	11%	7346%	2
{Gla Intercambio de FIX/K43I}/ Q286R/M298Q	{Gla Intercambio de FIX/K[43]I}/ Q143R/M156Q	902.4	360.6	40%	8144%	11
{Gla Intercambio de FIX/K43I}/ Q286R/M298Q †	{Gla Intercambio de FIX/K[43]I}/ Q143R/M156Q †	794.2	178.7	23%	11508%	6
{Gla Intercambio de FIX/K44S}/ Q286R/M298Q	{Gla Intercambio de FIX/Q[44]S}/ Q143R/M156Q	729.0	4.5	1%	6578%	2
{Gla Intercambio de FIX/M19K}/ Q286R/M298Q	{Gla Intercambio de FIX/M[19]K}/ Q143R/M156Q	512.0	51.4	10%	4620%	2
S52A/S60A/ Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156 Q	216.8	1.6	1%	1956%	2
Gla Intercambio de FIX/S52A/S60A/ Q286R/M298Q	Gla Intercambio de FIX/S[52]A/ S[60]A/Q143R/M156Q	988.7	207.5	21%	14327%	2
{Gla Intercambio de FIX/K43I} /T128N/P129A/Q286R/M2 98Q †	{Gla Intercambio de FIX/K[43]I}/ T[128]N/P[129]A/ Q143R/M156Q †	389.4	34.3	9%	5642%	2
S222A/H257A/Q286R/ M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	345.3	99.9	29%	3116%	3
T128N/P129A/S222A/ H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/H11 7A/Q143R/M156Q	24.8	17.2	69%	224%	4
T128N/P129A/S222A/ H257A/Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/S82A/H11 7A/Q143R/M156Q †	82.6	40.2	49%	1196%	3
S52A/S60A/S222A/H257A/ Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H117A /Q143R/M156Q	115.6	62.9	54%	1043%	2
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	7.7	1.8	23%	69%	2
S222A/H257A/Q286R/Q36 6V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	12.5	2.8	23%	113%	2
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	65.9	33.4	51%	595%	5
T129N/P129A/Q286R/M29 8Q/Q366N †	T[129]N/P[129]A/Q143R/M1 56Q/Q217N †	64.6	28.7	44%	936%	4
{Gla Intercambio de FIX/K43I}	{Gla Intercambio de FIX/K[43]I}	84.9	76.5	90%	1230%	4

392

/Q286R/M298Q/Q217N †	/Q143R/M156Q/Q217N †					
{Gla Intercambio de FIX/K43I} /T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N †	{Gla Intercambio de FIX/K[43]I} /T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N †	218.5	137.8	63%	3166%	3
Q286R/H373F	Q143R/H224F	81.6	123.7	152%	736%	9
T128N/P129A/ Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H224F	6.6	0.9	13%	59%	2
S52A/S60A/Q286R/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/H224F	30.1			272%	1
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	114.8	24.7	22%	1036%	5
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F †	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/H224F †	30.7	8.9	29%	277%	4
S52A/S60A/Q286R/M298Q /H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q/H224F	63.3	10.8	17%	571%	3
M298Q/H373F	M156Q/H224F	96.4	47.0	49%	870%	5
T128N/P129A/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/M156Q/H224F	91.6	48.0	52%	1327%	3
V158D/Q286R/E296V/M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	1023.9	339.3	33%	9240%	5
S222A/T239V	S82A/T99V	3.0			27%	1
Gla Intercambio de FIX /S222A/T239V/Q286R	Gla Intercambio de FIX /S82A/T99V/Q143R	17.4	2.2	13%	157%	3
Gla Intercambio de FIX /S222A/T239V/Q286R †	Gla Intercambio de FIX /S82A/T99V/Q143R †	87.9	61.7	70%	1274%	4
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	29.3	6.2	21%	264%	4
Gla Intercambio de FIX/ T239V/Q286R/M298Q	Gla Intercambio de FIX/ T99V/Q143R/M156Q	277.7	64.2	23%	2506%	3
Gla Intercambio de FIX/ T239V/Q286R/M298Q †	Gla Intercambio de FIX/ T99V/Q143R/M156Q †	902.4	323.5	36%	13076%	6
T128N/P129A/ T239V/Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/ T99V/Q143R/M156Q †	229.7	134.1	58%	3329%	5
S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/ M156Q	143.0	93.1	65%	1290%	10
T128N/P129A/ S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/ S82A/T99V/H117A/Q143R/ M156Q	179.0	80.5	45%	2593%	5
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	12.2			110%	1
T239V/Q286R/M298Q/H373F	T99V/Q143R/M156Q/H224F	40.7	5.2	13%	367%	2
T128N/P129A/T99V/Q143R/M156Q/H224F	T[128N]/P129]A/T99V/Q143R/M156Q/H224F	290.0	72.9	25%	4203%	4

393

V158D/T239I/E296V/M298Q	V21D/T99I/E154V/M156Q	216.3	32.5	15%	1951%	2
T239I/Q286R	T99I/Q143R	4.6	1.3	28%	41%	4
S222A/T239I	S82A/T99I	1.7			15%	1
Gla Intercambio de FIX /S222A/T239I/Q286R	Gla Intercambio de FIX /S82A/T99I/Q143R	20.3			184%	1
T239I/Q286R/M298Q	T99I/Q143R/M156Q	11.3	4.0	35%	102%	4
Gla Intercambio de FIX/ T239I/Q286R/M298Q	Gla Intercambio de FIX /T99I/Q143R/M156Q	244.0	9.6	4%	2202%	2
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q	T[128N]/P129]A/T99I/Q143R/M156Q	77.8	40.3	52%	1128%	5
S222A/T239I/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99I/H117A/Q143R/M156Q	51.6	5.7	11%	466%	2
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	1864.3	374.0	20%	16823%	2
V158D/T239V/E296V/M298Q †	V21D/T99V/E154V/M156Q †	4231.6	913.4	22%	61315%	4
T239V/Q286R	T99V/Q143R	11.8	4.1	35%	106%	4
T239I/Q286R/M298Q/H373F	T99I/Q143R/M156Q/H224F	13.1	3.8	29%	118%	3
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q/H373F †	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M156Q/H224F †	113.3	43.7	39%	1642%	5
H257S/Q286R/M298Q	H117S/Q143R/M156Q	27.4	4.1	15%	247%	4
Gla Intercambio de FIX /S8222A/H257S/Q143R	Gla Intercambio de FIX /S82A/H117S/Q143R	20.5	3.6	18%	185%	2
S222A/Q286R/M298Q/H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	41.7	9.1	22%	376%	4
H257S/Q286R/M298Q/H373F	H117S/Q143R/M156Q/H224F	30.4	9.1	30%	274%	3
S82A/Q143R/M156Q/H224F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	430.2	126.8	29%	3883%	3
Gla intercambio de FIX/S222A/Q286R/M298Q/H373F	Gla intercambio de FIX/ S82A/Q143R/M156Q/H224F	192.1	36.8	19%	1733%	2
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	252.9	7.4	3%	2282%	2
Gla intercambio de FIX/ S222A/Q286R/M298Q	Gla intercambio de FIX/ S82A/Q143R/M156Q	414.7	81.3	20%	3742%	2
T128N/P129A/A175S/Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/Q217V	3.4	1.0	29%	30%	2
A122N/G124S/A175S/Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/Q217V	3.0	0.8	26%	27%	4

T128N/P129A/A175S/S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A	1.9	0.5	26%	17%	2
T128N/P129A/A175S/Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R	3.3	1.2	37%	29%	4
A122N/G124S/A175S/Q286R	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R	3.0	0.7	23%	27%	2
Gla intercambio de FIX/ S222A/Q286R/H373F	Gla intercambio de FIX/ S82A/Q143R/H224F	81.2	66.7	82%	732%	2
V158D/E296V/M298Q/H373F	V21D/E154V/M156Q/H224F	1297.2	486.1	37%	11706%	4
H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	61.5	43.8	71%	555%	2
Gla intercambio de FIX/ T128N/P129A/A175S/S222A/Q286R	Gla intercambio de FIX/ T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/Q143R	30.5			276%	1
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	20.3	3.8	19%	183%	2
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F	V21D/Q143R/E154V/M156Q/H224F	573.6	100.4	18%	5176%	6
M298Q/Q366N/H373F †	M156Q/Q217N/H224F †	125.9	75.2	60%	1825%	4
T239V/M298Q/H373F †	T99V/M156Q/H224F †	319.5	125.0	39%	4629%	6
T239I/M298Q/H373F †	T99I/M156Q/H224F †	138.2	101.9	74%	2003%	7
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F †	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N/H224F †	160.9	43.3	27%	2331%	4
T239V/Q286R/M298Q/Q366N †	T99V/Q143R/M156Q/Q217N †	64.2	36.3	57%	931%	3
T239I/Q286R/M298Q/Q366N †	T99I/Q143R/M156Q/Q217N †	88.8	23.5	26%	1287%	5

† producido en células CHOX

§ producido en clon 52-5F7 de línea celular estable CHOX

Ejemplo 5

Determinación de la Inhibición de FVIIa/TF o FVIIa por AT-III/heparina

La potencia de la interacción entre el complejo de AT-III/heparina y FVIIa en la presencia o ausencia de factor de tejido soluble (sTF), esto es, dependiente de TF o independiente de TF, se evaluó al medir el nivel de inhibición de varias concentraciones de AT-III en la actividad catalítica de FVIIa/sTF

395

hacia un sustrato, Mesil-FPR-ACC. El valor $K_{0.5}$ se determinó para cada variante FVIIa probada, que corresponde a la concentración molar de AT-III que se requirió para inhibición al 50% (IC_{50}) de la variante FVIIa en un ensayo de 30 minuto a temperatura ambiente (~25°). Dos ensayos separados se prepararon, uno con sTF y uno sin sTF. Una solución 2μM de AT-III/heparina (heparina 5 μM final) se preparó al mezclar 26.4 μL de 151.7 μM AT-III (plasma AT-III humano purificado; Molecular Innovations) con 50 μL de 0.2 mM LMW heparina (CalBiochem), 400 μL de solución amortiguadora de ensayo 5× (Hepes 100 mM, NaCl 750 mM, $CaCl_2$ 25 mM, BSA 0.05%, PEG 8000 0.5%, pH 7.4) y 1.523 mL de agua de grado reactivo. Esta solución fue para usar como la concentración mayor en el ensayo dependiente TF. Una solución que contiene 4 μM AT-III/heparina (heparina 5 μM final) se preparó para usar en el ensayo independiente TF al mezclar 52.8 μL de 151.7 μM AT-III (Molecular Innovations) con 50 μL de heparina 0.2 mM LMW (CalBiochem), 400 μL de solución amortiguadora de ensayo 5× y 1.497 mL de agua de grado reactivo. Las soluciones AT-III/heparina se incubaron durante 5-10 minutos a temperatura ambiente y luego diluyó dos veces en una placa de polipropileno de 96 pozos profundos con un volumen final de 1 mL que contiene heparina 5 μM, que resulta en diluciones de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 0 nM, o 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, y 0 nM. Las variantes FVIIa y FVIIa tipo silvestre se diluyeron a 250 nM en solución amortiguadora de ensayo 1× (20 mM Hepes, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 5 mM, BSA 0.01%, PEG 8000 0.1%, pH 7.4). Para el ensayo dependiente TF, complejos 5 nM FVIIa/50 nM sTF se formaron al mezclar 20 μL de FVIIa con 10 μL de 5 μM sTF (R&D Systems Human Coagulation Factor III: #2339-PA), 200 μL de

solución amortiguadora de ensayo 5× y 770 µL de agua de grado reactivo e incubaron las soluciones durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Para el ensayo independiente TF, 100 µL de FVIIa se mezcló con 200 µL de solución amortiguadora de ensayo 5× y 700 µL de agua de grado reactivo para producir 25 nM soluciones de FVIIa. Para comenzar el ensayo, 25 µL de la FVIIa/TF o FVIIa solamente las soluciones se mezclaron por separado con 25 µL de cada dilución de AT-III/heparina en pozos de una placa de ensayo de la mitad de área negra de 96 pozos (Nunc). Las condiciones de ensayo final para el ensayo dependiente TF fueron 2.5 nM FVIIa/25 nM sTF y las concentraciones AT-III/heparina varían desde 1000 nM hasta 0 nM. Para el ensayo independiente TF, las concentraciones FVIIa fueron 12.5 nM FVIIa y las concentraciones AT-III/heparina varían desde 2000 nM hasta 0 nM. Las placas se incubaron durante 30 minutos con agitación a temperatura ambiente (~25°C).

Una solución de reserva de sustrato FVIIa (Mesil-FPR-ACC) se preparó al disolver el sustrato en DMSO a 20 mM luego preparando una solución de trabajo de 0.5 mM en solución amortiguadora de ensayo 1×. Después de la incubación de la placa de ensayo de arriba, 50 µl del sustrato FVIIa se agregó a cada pozo de la placa de ensayo. Las reacciones se mezclaron y la actividad residual de FVIIa se evaluó siguiendo las velocidades iniciales de escisión de sustrato durante 15 minutos en un lector de fluorescencia establecido a 30°C.

Para determinar el grado de inhibición por AT-III/heparina para variantes FVIIa o FVIIa, datos en bruto colectados con la aplicación SoftMax Pro (Molecular Devices) se exportaron como archivos .XML. Además se realizaron análisis de datos no lineales

000357

con XLfit4, un paquete de software para análisis estadístico y de ajuste de curva automático dentro del entorno de hoja de cálculo Microsoft Excel (Software IDBS). La plantilla de hoja de cálculo se usó para calcular la dilución AT-III en serie, relación de AT-III hasta FVIIa, y las relaciones Vi/Vo para cada replicado FVIIa en cada concentración AT-III experimental. El análisis de regresión no lineal de actividad FVIIa residual (expresado como Vi/Vo) contra concentración AT-III se procesó usando XLfit4 y una ecuación de inhibición hiperbólica de la forma ((C+(Amp*(1-(X/($K_{0.5}$+X)))))); donde C = el desplazamiento (fijado en 0 para permitir extrapolación de conjunto de datos que no alcanzan 100% de inhibición durante el curso del ensayo), Amp = la amplitud del ajuste y $K_{0.5}$, que corresponde a la concentración de AT-III requerida para la inhibición media máxima bajo las condiciones de ensayo. Para distintas variantes FVIIa, AT-III inhibido menos que 20-25% de la actividad de proteasa total en la concentración probada más alta de AT-III, que representa un límite superior de detección para el ensayo. Las variantes con menos que inhibición máxima 20-25% por consiguiente se les asignaron un valor $K_{0.5}$ de límite inferior (5 µM para dependiente de TF y 10 µM para independiente TF) y en más casos se esperan que tengan resistencias AT-III mayores que el valor reportado.

Las Tablas 16 y 17 proporcionan los resultados de los ensayos que se realizaron usando variantes FVIIa expresadas en células 293-F Freestyle TM y/o células BHK-21, en la presencia y ausencia de TF, respectivamente. Los resultados se presentan ambos como el parámetro $K_{0.5}$ ajustado y como una representación del grado de Resistencia AT-III para cada variante comparada con el FVIIa tipo silvestre

000368

expresado como una relación de sus valores $K_{0.5}$ ajustados (variante $K_{0.5}$/tipo silvestre $K_{0.5}$). Las distintas variantes FVIIa exhibidas incrementan Resistencia a AT-III comparadas con FVIIa tipo silvestre. Por ejemplo, Q286R-FVIIa (esto es, FVIIa que contiene la mutación Q286R), Q286R/S222A-FVIIa, Q286R/S222A/Gla Intercambio FIX-FVIIa, A175S/Q286R/Q366V-FVIIa, Q286M-FVIIa, Q286L-FVIIa y Q286Y-FVIIa están entre el grupo que exhibe resistencia a AT-III en la ausencia de TF que fue sobre 4 veces mayor que de FVIIa tipo silvestre.

Tabla 16. Inhibición de variantes FVIIa por AT-III/heparina en la presencia de TF

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ensayo de Resistencia ATIII Dependiente de TF			
		Células 293-F		Células BHK-2193-F	
		$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5tn}$	$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5tn}$
TN	TN	72.3	1.0	56.0	1.0
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	75.1	1.0	79.0	1.4
Q286R	Q143R	60.6	0.8	59.1	1.1
S222A	S82A	47.6	0.7	43.9	0.8
H257S	H117S	50.6	0.7	52.9	0.9
H373D	H224D	423.6	5.9		
H373E	H224E	152.1	2.1		
H373S	H224S	64.2	0.9		
H373F	H224F	38.7	0.5		
H373A	H224A	76.9	1.1		
Q366D	Q217D	2239.2	31.0		
Q366E	Q217E	116.2	1.6		
Q366N	Q217N	75.3	1.0		
Q366T	Q217T	57.5	0.8		
Q366S	Q217S	107.2	1.5		
Q366V	Q217V	25.8	0.4	20.0	0.4
A175S	A39S	112.4	1.6		
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	48.2	0.7		
Q286R/S222A	Q143R/S82A			53.3	1.0
Q286R/S222A/ Gla Intercambio de FIX	Q143R/S82A/Gla Intercambio de FIX	83.7	1.2		
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q			74.2	1.3
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q			21.8	0.4
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE			101.1	1.8
P321K	P170iK			97.5	1.7
P321E	P170iE			66.0	1.2

000369

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ensayo de Resistencia ATIII Dependiente de TF			
		Células 293-F		Células BHK-2193-F	
		$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5tn}$	$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5tn}$
P321Y	P170iY			49.5	0.9
P321S	P170iS			60.7	1.1
T239S	T99S	254.6	3.5		
T239Q	T99Q			117.2	2.1
T239V	T99V			42.5	0.8
T239L	T99L			81.1	1.4
T239H	T99H			52.0	0.9
T239I	T99I			125.3	2.2
H257A/M298Q	H117A/M156Q			89.1	1.6
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	66.6	0.9		
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V			62.0	1.1
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V			72.0	1.3
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V			38.5	0.7
Q286M	Q143M	53.1	0.7		
Q286L	Q143L	114.4	1.6		
Q286Y	Q143Y	131.3	1.8		
Q366I	Q217I	23.2	0.3		
Q366L	Q217L	23.0	0.3		
Q366M	Q217M	35.4	0.5		

Tabla 17. Inhibición de variantes FVIIa por AT-III/heparina en la ausencia de TF

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ensayo de Resistencia ATIII Dependiente de TF			
		Células 293-F		Células BHK-2193-F	
		$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5tn}$	$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5tn}$
TN	TN	2265	1.0	2222	1.0
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	389	0.2	415	0.2
Q286R	Q143R	10000	>4.4	10000	>4.5
S222A	S82A	2338	1.0	2088	0.9
H257S	H117S	5884	2.6	5584	2.5
H373D	H224D	10000	>4.4		
H373E	H224E	6949	3.1		
H373S	H224S	9513	4.2		

400

000370

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ensayo de Resistencia ATIII Dependiente de TF			
		Células 293-F		Células BHK-2193-F	
		$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5tn}$	$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5tn}$
H373F	H224F	1306	0.6		
H373A	H224A	10000	>4.4		
Q366D	Q217D	10000	>4.4		
Q366E	Q217E	6901	3.0		
Q366N	Q217N	5186	2.3		
Q366T	Q217T	5885	2.6		
Q366S	Q217S	10000	>4.4		
Q366V	Q217V	487	0.2	531	0.2
A175S	A39S	5785	2.6		
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	2926	1.3		
Q286R/S222A	Q143R/S82A			10000	>4.5
Q286R/S222A/ Gla Intercambio de FIX	Q143R/S82A/Gla Intercambio de FIX	10000	>4.4		
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q			3663	1.6
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q			72	
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE			5182	2.3
P321K	P170iK			5274	2.4
P321E	P170iE			3666	1.6
P321Y	P170iY			705	0.3
P321S	P170iS			2689	1.2
T239S	T99S	10000	>4.4		
T239Q	T99Q			2222	1.0
T239V	T99V			2644	1.2
T239L	T99L			8532	3.8
T239H	T99H			10000	>4.5
T239I	T99I			10000	>4.5
H257A/M298Q	H117A/M156Q			1344	0.6
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	7742	3.4		
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V			2251	1.0
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V			10000	>4.5
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V			3398	1.5
Q286M	Q143M	10000	>4.4		
Q286L	Q143L	10000	>4.4		
Q286Y	Q143Y	10000	>4.4		
Q366I	Q217I	599	0.3		
Q366L	Q217L	1708	0.8		
Q366M	Q217M	914	0.4		

Un conjunto adicional de experimentos se realizaron para evaluar la inhibición de variantes FVIIa por AT-III/heparina en la ausencia de TF usando el mismo ensayo como se describió anteriormente con menores modificaciones. La heparina no dividida (Calbiochem), de longitud completa, se usó en lugar de heparina de bajo

401

000371

peso molecular (LMW-heparina) para incrementar la velocidad de la reacción de inhibición (ver por ejemplo, Olson et al. (2004) Thromb Haemost 92(5), 929-939). El tiempo de incubación del ensayo se incrementó a 60 minutos, y la concentración del sustrato de mesil-FPR-ACC usado para determinar actividad residual se incrementó a una concentración final de 0.5 mM.

La Tabla 18 proporciona los resultados de los ensayos que se realizaron en la ausencia de TF usando variantes FVIIa expresadas en células BHK-21 y células CHOX. Los resultados se presentan ambos como el parámetro $k_{0.5}$ ajustado y como una representación del grado de resistencia AT-III para cada variante comparada con el FVIIa tipo silvestre expresado como una relación de sus valores $K_{0.5}$ ajustados (mutante $K_{0.5}$/tipo silvestre $K_{0.5}$). La desviación estándar (SD) y número de ensayos (n) también se muestran.

Tabla 18. Inhibición de variantes FVIIa por AT-III/heparina en la ausencia de TF

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	SD	%CV	$K_{0.5mut}/K_{0.5tn}$	n
TN (NovoSeven®)	TN (NovoSeven®)	424.3	70.9	17%	1.08	33
TN (NovoSeven-RT®)	TN (NovoSevenRT®)	424.2	60.5	14%	1.08	5
TN	TN	393.8	67.8	17%	1.00	4
TN †	TN †	503.0	120.0	24%	1.00	4
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	465.3	28.1	6%	1.18	2
Gla intercambio de FIX	Gla intercambio de FIX	298.9			0.76	1
K109N	K[109]N	330.1	72.3	22%	0.84	2
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	372.5	28.6	8%	0.95	2
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A	360.6			0.92	1
M298Q	M156Q	120.1	14.1	12%	0.31	5
M298Q †	M156Q †	130.0	14.3	11%	0.26	2
T128N/P129A/M298Q †	T[128]N/P[129]A/M156Q †	143.9	14.5	10%	0.29	2
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	75.5	10.1	13%	0.19	27
V158D/E296V/M298Q †	V21D/E154V/M156Q †	77.4	18.0	23%	0.15	7
T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q	T[128]N/P[129]A/V21D/E154V/M156Q	81.6	3.8	5%	0.21	2
S52A/S60A/V158D/E296V/M298Q	S[52]A/S[60]A/V21D/E154V/M156Q	78.8	2.9	4%	0.20	2
Q286R	Q143R	1085.1	320.0	29%	2.76	20
T128N/P129A/Q286R	T[128]N/P[129]A/Q143R	1645.2	440.2	27%	4.18	9

403

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	SD	%CV	$K_{0.5mut}/K_{0.Stn}$	n
T128N/P129A/Q286R †	T[128]N/P[129]A/Q143R †	1739.2	467.0	27%	3.46	5
S52A/S60A/Q143R	S[52]A/S[60]A/Q143R	1318.0	376.8	29%	3.35	2
S222A	S82A	383.5	84.4	22%	0.97	3
T128N/P129A/S222A	T[128]N/P[129]A/S82A	401.0			1.02	1
H257S	H117S	722.8			1.84	1
Q366V	Q217V	101.1	24.7	24%	0.26	3
Gla intercambio de FIX/Q366V	Gla intercambio de FIX/Q217V	108.2	5.8	5%	0.27	2
A175S	A39S	1328.0	96.2	7%	3.37	3
K109N/A175S	K[109]N/A39S	2031.8	401.2	20%	5.16	2
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	1637.2	171.3	10%	4.16	2
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	1392.7	295.3	21%	3.54	2
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	1345.8	241.1	18%	3.42	2
Q286R/H257A	Q143R/H117A	2398.7	551.2	23%	6.09	9
Q286R/H257A †	Q143R/H117A †	2800.8	938.4	34%	5.57	5
Q286R/S222A	Q143R/S82A	1203.0	191.2	16%	3.05	2
Gla intercambio de FIX/T128N/P129A/ S222A/Q286R	Gla intercambio de FIX/ T[128]N/P[129]A/ S82A/Q143R	1703.2	145.2	9%	4.32	2
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	2592.0	806.5	31%	6.58	4
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	299.3	62.9	21%	0.76	7
Q286R/M298Q †	Q143R/M156Q †	287.3	26.6	9%	0.57	20
Q286R/M298Q §	Q143R/M156Q §	395.1	56.4	14%	0.79	3
Gla intercambio de FIX/Q286R/M298Q	Gla intercambio de FIX/Q143R/M156Q	281.6	43.2	15%	0.72	3
Gla intercambio de FIX/Q286R/M298Q †	Gla intercambio de FIX/Q143R/M156Q †	238.2	21.6	9%	0.47	3
T128N/P129A/Q286R/ M298Q	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q	283.7	49.4	17%	0.72	13
T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q †	283.7	77.6	27%	0.56	3
Gla intercambio de FIX /T128N/P129A/Q286R/ M298Q	Gla intercambio de FIX /T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q	508.2	197.0	39%	1.29	3
Gla intercambio de FIX /T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	Gla intercambio de FIX /T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q †	325.2	82.2	25%	0.65	2
{Gla intercambio de FIX/E40L}/ Q286R/M298Q	{Gla intercambio de FIX/E[40]L}/ Q143R/M156Q	286.7	2.4	1%	0.73	2
{Gla intercambio de FIX/K43I}/	{Gla intercambio de FIX/K[43]I}/	244.3	29.8	12%	0.62	5

407

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	SD	%CV	$K_{0.5mut}/K_{0.stn}$	n
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q					
{Gla intercambio de FIX/K43I}/ Q286R/M298Q †	{Gla intercambio de FIX/K[43]I}/ Q143R/M156Q †	219.3	13.7	6%	0.44	2
{Gla intercambio de FIX/Q44S}/ Q286R/M298Q	{Gla intercambio de FIX/Q[44]S}/ Q143R/M156Q	271.4	12.4	5%	0.69	2
{Gla intercambio de FIX/M19K}/ Q286R/M298Q	{Gla intercambio de FIX/M[19]K}/ Q143R/M156Q	309.6			0.79	1
Gla swap FIX /S52A/S60A/ Q286R/M298Q †	Gla swap FIX /S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q †	253.6			0.50	1
{Gla intercambio de FIX/M19K/E40L/K43I/Q44S}/ Q286R/M298Q	{Gla intercambio de FIX/M[19]K/ E[40]L/ K[43]I/ Q[44]S} /Q143R/M156Q	339.3	100.8	30%	0.86	2
{Gla intercambio de FIX/K43I}/T128N/P129A/ Q286R/M298Q †	{Gla intercambio de FIX/K[43]I}/ T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q †	222.5	10.7	5%	0.44	2
S222A/H257A/Q286R/ M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	313.9			0.80	1
T128N/P129A/S222A/ H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/H117A/Q143R/M156Q	653.0	127.9	20%	1.66	4
T128N/P129A/S222A/ H257A/Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/S82A/H117A/Q143R/M156Q †	327.7	23.2	7%	0.65	2
S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H117A/ Q143R/M156Q	447.6	117.6	26%	1.14	3
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	324.1	77.9	24%	0.82	3
T128N/P129A/Q286R/M298Q/ Q366N †	T[129]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N †	345.8	24.2	7%	0.69	3
{Gla intercambio de FIX/K43I}/Q286R/M298Q/Q366N †	{Gla intercambio de FIX/K[43]I}/Q143R/M156/Q217N †	404.4	48.0	12%	0.80	3
{Gla intercambio de FIX/K43I} /T[128]N/P[129]A/Q286R/M298Q/Q366N †	{Gla intercambio de FIX/K[43]I}/ T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N †	319.1	71.8	22%	0.63	2
Q286R/H373F	Q143R/H224F	620.8	133.4	3%	1.58	2
T128N/P129A/ Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H224F	590.4	104.2	18%	1.50	4
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	152.1	7.2	5%	0.39	3
T128N/P129A/Q286R/M298Q/ H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/H224F	182.6	43.2	24%	0.46	5

405

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	SD	%CV	$K_{0.5mut}/K_{0.5tn}$	n
M298Q/H373F	M156Q/H224F	81.7	10.5	13%	0.21	2
T128N/P129A /M156Q/H224F †	T[128]N/P[129]A /M156Q/H224F †	89.1	3.8	4%	0.18	2
V21D/Q143R/E154V/M156Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	85.0	14.7	17%	0.22	13
S222A/T239V	S82A/T99V	967.3	282.6	29%	2.46	5
Gla intercambio de FIX /S222A/T239V/Q286R	Gla intercambio de FIX /S82A/T99V/Q143R	2438.4	269.4	11%	6.19	2
Gla intercambio de FIX /S222A/T239V/Q286R †	Gla intercambio de FIX /S82A/T99V/Q143R †	1343.5	507.1	38%	2.67	3
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	3626.9	1465.9	40%	9.21	4
Gla intercambio de FIX/ T239V/Q286R/M298Q	Gla intercambio de FIX/ T99V/Q143R/M156Q	483.7	65.6	14%	1.23	2
Gla intercambio de FIX/ T239V/Q286R/M298Q †	Gla intercambio de FIX/ T99V/Q143R/M156Q †	314.3			0.62	1
T128N/P129A/ T239V/Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/ T99V/Q143R/M156Q †	266.4	52.1	20%	0.53	2
S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/M 156Q	469.3	133.2	28%	1.19	6
T128N/P129A/ S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/ S82A/T99V/H117A/Q143R/M 156Q †	326.5	55.3	17%	0.65	2
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	630.6	194.0	31%	1.60	3
T128N/P129A/T239V/Q286R/ M298Q/H373F †	T[128N]/P129]A/T99V/Q143R /M156Q/H224F †	121.2	25.8	21%	0.24	4
V158D/T239I/E296V /M298Q	V21D/T99I/E154V /M156Q	179.5	50.5	28%	0.46	5
T239I/Q286R	T99I/Q143R	5823.0	2185.5	38%	14.79	9
S222A/T239I	S82A/T99I	1149.8	12.8	1%	2.92	2
GlaIntercambio de FIX/S222A/T239I/Q286R	Gla intercambio de FIX /S82A/T99I/Q143R	3313.1	130.3	4%	8.41	2
T239I/Q286R/M298Q	T99I/Q143R/M156Q	1611.4	185.9	12%	4.09	2
Gla intercambio de FIX/ T239I/Q286R/M298Q	Gla intercambio de FIX /T99I/Q143R/M156Q	1171.3	104.5	9%	2.97	2
T128N/P129A T239I/Q286R/M298Q †	T[128N]/P129]A T99I/Q143R/M156Q †	917.0	60.5	7%	1.82	3
S222A/T239I/H257A/Q286R/ M298Q	S82A/T99I/H117A/Q143R/M1 56Q	1223.6	18.9	2%	3.11	2
T239I/Q286R/H373F	T99I/Q143R/H224F	1007.6	29.8	3%	2.56	2
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	67.7	16.6	24%	0.17	4

406

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	SD	%CV	$K_{0.5mut}/K_{0.5in}$	n
V158D/T239V/E296V/M298Q †	V21D/T99V/E154V/M156Q †	67.1			0.13	1
T239V/Q286R	T99V/Q143R	1787.9	106.3	6%	4.54	2
T239I/Q286R/M298Q/ H237F	T99I/Q143R/M156Q/H224F	370.4	3.0	1%	0.94	2
T128N/P129AT239I/Q286R/M298Q H237F †	T[128]N/P[129]AT99I/Q143R/M156Q /H224F †	316.6	24.7	8%	0.63	2
S222A/H257S/Q286R/ M298Q	S82A/H117S/Q143R/M156Q	526.7			1.34	1
S222A/Q286R/M298Q/ H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	163.2	46.9	29%	0.41	4
Gla intercambio de FIX/S222A/ Q286R/M298Q/H373F	Gla intercambio de FIX S82A/Q143R/M156Q/H224F	163.5	58.2	36%	0.42	4
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	308.4	119.9	39%	0.78	4
Gla intercambio de FIX/ S222A/Q286R/M298Q	Gla intercambio de FIX S82A/Q143R/M156Q	266.3	104.2	39%	0.68	4
T128N/P129A/A175S/Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/Q217V	332.6	56.2	17%	0.84	3
A122N/G124S/A175S/Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/Q217V	336.1	11.0	3%	0.85	3
T128N/P129A/A175S/S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A	1913.4			4.86	1
A122N/G124S/A175S/S222A	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A	1548.6	394.1	25%	3.93	2
T128N/P129A/A175S/Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R	9545.5	2797.3	29%	24.24	2
A122N/G124S/A175S/Q286R	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R	6923.3			17.58	1
Gla intercambio de FIX/ S222A/Q286R/H373F	Gla intercambio de FIX/ S82A/Q143R/H224F	587.3	5.1	1%	1.49	2
H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	390.8			0.99	1
Gla intercambio de FIX/ T128N/P129A/A175S/ S222A/Q286R	Gla intercambio de FIX/ T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/Q143R	6486.4	148.2	2%	16.47	2
Gla intercambio de FIX/ A122N/G124S/A175S/ S222A/Q286R	Gla intercambio de FIX/ A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/Q143R	5524.0	1434.1	26%	14.03	2
T128N/P129A/A175S/ Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156Q	2311.8	520.7	23%	5.87	2
A122N/G124S/A175S/ Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q	1954.2	450.7	23%	4.96	2
T128N/P129A/A175S/ S222A/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	3212.9	1140.7	36%	8.16	2
A122N/G124S/A175S/	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/	2972.8	751.2	25%	7.55	2

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	SD	%CV	$K_{0.5mut}/K_{0.5tn}$	n
S222A/H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q					
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156Q/H224F	1132.4	441.3	39%	2.88	2
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q/H224F	1000.1	184.3	18%	2.54	2
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F	V21D/Q143R/E154V/M156Q/H224F	62.1	10.5	17%	0.16	1 1
M298Q/Q366N/H373F †	M156Q/Q217N/H224F	90.8	4.8	5%	0.18	2
T239V/M298Q/H373F †	T99V/M156Q/H224F	46.6	7.9	17%	0.09	2
T239I/M298Q/H373F †	T99I/M156Q/H224F	178.7	29.7	17%	0.36	2
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F †	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N/H224F	148.3	12.9	9%	0.29	2
T239V/Q286R/M298Q/Q366N †	Q143R/M156Q/Q217N/T99V	252.2	40.9	16%	0.50	2
T239I/Q286R/M298Q/Q366N †	T99I/Q143R/M156Q/Q217N	813.2	105.1	13%	1.62	2

† producido en células CHOX

§ producido en clon 52-5F7 de línea celular estable CHOX

Ejemplo 6

Evaluación in vivo de actividad pro-coagulante de polipéptido FVIIa

Los modelos de ratón de hemofilia A se establecieron para evaluar la actividad pro-coagulante de polipéptidos FVIIa. La Hemofilia A fue inducida en ratones CD-1 por administración intraperitoneal de anticuerpos anti-FVIII, seguido por remoción quirúrgica de las puntas de las colas para iniciar el sangrado. Ratones deficientes en FVIII (ratones $FVIII^{-/-}$) también se usaron, pero no se trataron con anticuerpos anti-FVIII. Los ratones se trataron luego con polipéptido FVIIa y la cantidad de pérdida de sangre en 20 minutos se midió para determinar la actividad pro-coagulante de los polipéptidos FVIIa.

408

A. Evaluación in vivo de actividad pro-coagulante FVIIa tipo silvestre

Un modelo de ratón de hemofilia A se estableció para evaluar la actividad pro-coagulante de polipéptidos FVIIa. La hemofilia A fue inducida en ratones CD-1 por administración de anticuerpos anti-FVIII, seguido por remoción quirúrgica de las puntas de las colas para iniciar el sangrado. Los ratones se trataron luego con polipéptido FVIIa y el tiempo necesario para detener el sangrado, y la cantidad de pérdida de sangre durante este tiempo, se midió para determinar la actividad pro-coagulante de los polipéptidos FVIIa.

Los ratones CD-1 machos se anestesiaron por administración intraperitoneal de tanto sodio de tiobarbital en 100 mg/kg, como cetamina en 100 mg/kg. La lidocaína se administró por inyección subcutánea en el cuello ventral para reducir la sensibilidad. La tráquea y arteria carótida se canularon a través de una pequeña incisión en el cuello para facilitar la respiración sin restricción y la administración de anticuerpo anti-Factor VIII, Factor VIIa humano recombinante (rhFVIIa) y/o polipéptidos FVII modificados.

A los ratones canulados se les administraron 3.76 mg de anticuerpo anti-humano-FVIII de cabra (Affinity Biologicals, lote IG129R4, ratón 612 BU/ml) en 40 µL. Esta dosis se determinó al conducir un experimento de respuesta de dosis inicial con el anticuerpo (usando 0.376, 0.94, 1.88 y 3.76 mg de anti-humano-FVIII), y evaluación de pérdida de sangre y tiempo de sangrado. Después de 20 minutos, las colas de los

409

ratones se colocaron en placas en tubos 15 mL que contienen solución salina amortiguada con fosfato 39°C (PBS) durante un periodo de 10 minutos. En 30 minutos, las colas se removieron brevemente de la solución PBS y los últimos 5 mm de las colas se cortaron para iniciar el sangrado. Se observó el tiempo en el que comenzó el sangrado. Las colas se regresaron luego al tubo que contiene PBS 39°C y se permitió sangrar durante 5 minutos (pre-sangrado) para asegurar que los ratones han respondido al anticuerpo anti-FVIII. Después del pre-sangrado, a los ratones se les administraron polipéptidos FVIIa o el vehículo en el cual las proteínas FVIIa se prepararon y liberaron. Los polipéptidos FVIIa se diluyeron en cualquier PBS o una solución amortiguadora compuesta de cloruro de sodio 52 mM, 10.2 mM cloruro de sodio deshidratado, 9.84 mM glicilglicina, polisorbato 80 0.01% y manitol 165 mM. Las preparaciones FVIIa se administraron en ya sea 1, 3 o 10 mg/kg, en un volumen equivalente a 3 ml/kg, por medio de las cánulas de la carótida y las colas se colocaron en placas en tubos nuevos que contienen PBS 39°C. El sangrado se vigiló durante un periodo de 20 minutos y los tiempos en los cuales el sangrado se detuvo se observaron. El tiempo de sangrado total se calculó como la suma de la duración de sangrado durante el pre-sangrado, y la duración de sangrado después de la administración de polipéptidos FVIIa, o PBS o solución amortiguadora.

Para determinar la cantidad de pérdida de sangre durante los episodios de sangrado, los contenidos de los tubos 15mL se evaluaron para el contenido de la hemoglobina. El Triton X-100

se diluyó 1 en 4 en agua estéril y 100 µL se agregó a 1 mL de las muestras para causar hemólisis. La absorbancia de la muestras se midió luego en una longitud de onda de 546 nm. Para calcular la cantidad de pérdida de sangre, la absorbancia se leyó contra una curva estándar generada al medir la absorbancia en 546 nm de volúmenes conocidos de sangre de murino, diluida en PBS y hemolizada como arriba con Triton X 100.

Un experimento se llevó a cabo comparando rhFVIIa generado como se describió anteriormente con el FVIIa humano recombinante comercialmente disponible (NovoSeven®, Novo Nordisk) y la pérdida de la sangre se evaluó después de la administración de una dosis 3 mg/kg de cada proteína. La pérdida de la sangre en el grupo de vehículo (solución amortiguadora, n = 15) fue 671.9 ± 57.89 µl durante el periodo de 20 minutos. Esto se redujo por el rhFVIIa producido por Catalyst Biosciences a 264.1 ± 56.59 µl y por NovoSeven® a 273.7 ± 53.93 µl (n = 14). Este experimento demostró equivalencia entre las dos proteínas.

B. Análisis de la actividad coagulante de variantes FVIIa en ratones CD-1 con hemofilia A inducida

Los experimentos iniciales se llevaron a cabo para determinar la dosis requerida y tiempo y duración de efecto de anticuerpos anti-humano-FVIII cuando se da por la vía intraperitoneal para inducir hemofilia en ratones CD-1. Para el primer lote de anti-FVIII (lote 1; Affinity Biologicals, lote IG129R4), este se basó inicialmente en la dosis usada para los experimentos de canulación, descritos

anteriormente. La dosis determinada para causar un estado hemofílico (sangrado incontrolable durante un periodo de ensayo de 20 minutos) fue 7.54 mg/ratón (80 µl de una solución de reserva 94.25 mg/ml). Este lote tuvo una actividad neutralizante de 612 ratón BU/ml. Para el segundo lote de FVIII anti-humano (lote 2; Affinity Biologicals, lote IG1577R2, actividad neutralizante de 474 ratón BU/ml) la dosis usada fue 11.98 mg/ratón (120 µl de una solución de reserva 99.8 mg/ml) y se administró en 6 horas antes de cortar la cola.

Para inducir hemofilia, los ratones CD-1 machos (25-35 g) se dosificaron intraperitonealmente con lote 1 o lote 2 de anti-FVIII antes del experimento. Los ratones CD-1 machos y $FVIII^{-/-}$ se anestesiaron por administración intraperitoneal de un coctel de cetamina/xilacina (45 mg/mL y 3.6 mg/mL, respectivamente, en solución salina) y colocó en una plataforma calentada (39°C) para asegurar que no hubo disminución en la temperatura corporal. El cuarto de procedimientos se mantuvo en una temperatura de 27.7°C (82°F). Diez minutos antes de cortar la cola la cola se sumergió en 10 mls de PBS pre-entibiado (tubo centrífugo 15 ml; 39°C). Ocho hasta diez ratones se inyectaron con FVIIa humano recombinante (Novoseven®, Novo Nordisk) o polipéptidos FVII modificados diluidos en una solución amortiguadora compuesta de cloruro de sodio 52 mM, cloruro de sodio deshidratado 10.2 mM, glicina de glicilo 9.84 mM, polisorbato 80 0.01% y manitol 165 mM por medio de la vena de la cola en una inyección sencilla. El vehículo solo también se inyectó en un grupo de ratones como un control. Si la

inyección se perdió, el animal se excluyó del estudio. La inyección con polipéptido FVIIa o vehículo se hizo 5 minutos antes de cortar la cola. Un corte de cola se hizo usando una navaja de afeitar 5 mm del extremo de la cola y la sangre se colectó en PBS durante un periodo de 20 minutos. Al final del periodo de colección, la pérdida de sangre total se evaluó. Los tubos de colección se mezclaron y una alícuota 1 ml de cada muestra se tomó y analizó para el contenido de la hemoglobina. El Triton X-100 se diluyó 1 en 4 en agua estéril y 100 µL se agregó a las muestras 1 mL para causar hemólisis. La absorbancia de las muestras se midió luego en una longitud de onda de 546 nm. Para calcular la cantidad de pérdida de sangre, la absorbancia se leyó contra una curva estándar generada al medir la absorbancia en 546 nm de volúmenes conocidos de sangre de murino, diluida en PBS y hemolizada como arriba con Triton X 100.

1. Estudio de respuesta de dosis que evalúa la actividad coagulante FVIIa de tipo silvestre

También se realizó un estudio de respuesta de dosis en el cual 0.3, 1 ó 3 mg/kg de FVIIa de tipo silvestre se evaluó. Los ratones que reciben el vehículo pierden 1002.3 ± 60.71 µL en el ensayo de 20 minutos. Esto se redujo significativamente en ratones que se administraron 3 mg/kg de FVIIa de tipo silvestre, hasta 415.5 ± 90.85 µL ($p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido por prueba posterior de Dunn). Reducir la dosis hasta 1 mg/kg resulta en pérdida sanguínea de 679.57 ± 83.95 µL y una dosis inferior de 0.3 mg/kg resulta en pérdida sanguínea

413

de 852.42 ± 94.46 µL.

2. Análisis inicial de actividad coagulante de variante FVIIa

La inyección solo de vehículo se usó como un control. Los ratones que reciben el vehículo solamente pierden 915.2 ± 105.6 µL en el ensayo de 20 minutos, que se redujo hasta 352 ± 99.86µL (media ± S. E. M) si los ratones se administraron con FVIIa humano recombinante. La cantidad de sangre perdida se redujo aún además hasta 165.8 ± 48.41 µL si los ratones se administraron Q286R-FVIIa (esto es FVIIa que contiene la mutación Q286R), hasta 141.3 ± 43.77 µL con Q286R/M298Q-FVIIa o hasta 129.5 ± 36.64 µL con V158D/E296V/M298Q-FVIIa. Los ratones administrados con S222A-FVIIa también muestran pérdida sanguínea reducida (hasta 225.7 ± 62.75 µL) comparados con ratones administrados con FVIIa de tipo silvestre. La administración de Gla Intercambio FIX-FVIIa, Q366V-FVIIa o A122N/G124S-FVIIa resulta en aproximadamente la misma cantidad de pérdida sanguínea como aquella observada en ratones que se les da FVIIa humano recombinante (334.6 ± 54.95µL, 321.7 ± 102.6 µL y 329.8 ± 83.91 µL respectivamente), mientras que los ratones que se administraron con H257A-FVIIa, S222A/Q286R-FVIIa, o H257A-FVIIa aparecen para tener pérdida sanguínea ligeramente mayor (390 ± 107 µL, 447.3 ± 127.7 µL y 443.7 ± 139.5 µL respectivamente).

3. Respuesta de dosis que evalúa la actividad coagulante de variante FVIIa

Un estudio de respuesta de dosis en el cual 0.1, 0.3, 1

ó 3 mg/kg de Q286R-FVIIa, S222 A-FVIIa, Q286R/M298Q-FVIIa o V158D/E296V/M298Q-FVIIa se administraron a los ratones. Los ratones que reciben el vehículo solamente pierden 915.2 ± 105.6 µL de sangre en el ensayo de 20 minutos. Esto se redujo significativamente en ratones que se administraron con 3 mg/kg de cualquiera de Q286R-FVIIa (141.3 ± 43.77 µL), S222A-FVIIa (225.7 ± 62.75µL) o Q286R/M298Q-FVIIa (129.5 ± 36.64 µL) ($p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido por prueba posterior de Dunn). Reduciendo la dosis hasta 1 mg/kg resulta en pérdida sanguínea de 641 ± 96.48 µL en ratones que reciben Q286R-FVIIa y 487.92 ± 92.07µL en ratones que reciben S222A-FVIIa. Las dosis inferiores de esta variante FVIIa resultan en aproximadamente la misma pérdida sanguínea (817.71 ± 107.94 µL y 900.34 ± 115.77 µL para Q286R-FVIIa y S222 A-FVIIa respectivamente) como se observa en ratones que reciben el control de vehículo. En contraste, los ratones que reciben 1 mg/kg de Q286R/M298Q-FVIIa tienen significativamente pérdida sanguínea reducida (69.36 ± 15.55 µL) comparados con los ratones de control solamente con vehículo. En dosis inferiores de 0.3 mg/kg y 0.1 mg/kg, la pérdida sanguínea fue 538.3 ± 94.04 µL y 664 ± 121.6 µL, respectivamente. Los ratones que reciben 0.3, 1 y 3 mg/kg de V158D/E296V/M298Q-FVIIa tienen pérdida sanguínea de 754.49 ± 121.6 µL, 481.95 ± 114.22 µL y 133.25 ± 50.09 µL respectivamente.

Los estudios de respuesta de dosis adicionales se llevaron a cabo para Q286R-FVIIa, Q286R/M298Q-FVIIa y V158D/E296V/M298Q-FVIIa y los datos combinados con aquellos de arriba. En los experimentos que evalúan el efecto de

415

Q286R-FVIIa, el grupo que recibe el vehículo pierde 833.61 ± 73.95 µL de sangre. Esto se redujo significativamente hasta 196.71 ± 49.18 µL en ratones que se trataron con 3 mg/kg de Q286R-FVIIa. Reducir la dosis hasta 1 mg/kg resulta en pérdida sanguínea de 577.78 ± 66.29 µL. Cuando los ratones se dosificaron con 0.1 y 0.3 mg/kg de Q286R-FVIIa la pérdida sanguínea producida fue similar al valor del control de vehículo (739.58 ± 104.28 µL y 806.63 ± 65.17 µL, respectivamente). En los experimentos que evalúan el efecto de Q286R/M298Q-FVIIa, el grupo de vehículo produce pérdida sanguínea de 902.42 ± 88.04 µL, que se redujo significativamente por el tratamiento con tanto 1 como 3 mg/kg de Q286R/M298Q-FVIIa hasta 145.17 ± 38.89 µL y 140.76 ± 33.36 µL de pérdida sanguínea. Reducir la dosis hasta 0.1 y 0.3 mg/kg resulta en valores de pérdida sanguínea de 664.03 ± 121.62 µL y 551.94 ± 67.60 µL respectivamente. En los experimentos que evalúan V158D/E296V/M298Q-FVIIa el grupo de control de vehículo demuestra pérdida sanguínea de 966.64 ± 57.97 µL, que se redujo significativamente por el tratamiento con V158D/E296V/M298Q-FVIIa a 3 mg/kg hasta 128.19 ± 27.73 µL. Reducir la dosis hasta 1 mg/kg lleva a pérdida sanguínea de 565.50 ± 65.78 µL y reducir la dosis además hasta 0.3 y 0.1 mg/kg produce pérdida sanguínea que fue similar al grupo de control (811.16 ± 71.87 µL y 893.62 ± 106.73 µL). Se hizo el análisis estadístico por Kruskal Wallis seguido por prueba posterior de Dunn y importancia se aceptó cuando $p < 0.05$.

4. Actividad coagulante de H216A-FVIIa, H373F-FVIIa,

416

Q366D-FVIIa y Q366N-FVIIa en una dosis de 3 mg/kg.

Un conjunto de experimentos probados H216A-FVIIa, H373F-FVIIa, Q366D-FVIIa y Q366N-FVIIa en una dosis de 3 mg/kg. La inyección solo de vehículo se usó como un control. Los ratones que reciben el vehículo pierden 915.2 ± 105.6 µL en el ensayo de 20 minutos. Esto se redujo aún además hasta 211.1 ± 67.70µL si los ratones se trataron con H373F-FVIIa. La pérdida sanguínea se afectó menos durante el tratamiento con H216A-FVIIa, Q366D-FVIIa y Q366N-FVIIa, con valores de 558.6 ± 66.22, 577.1 ± 151.4 y 477.1 ± 112.6µL respectivamente.

4. Actividad coagulante de intercambio Q286R/M298Q/Gla FIX-FVIIa, S222A/H257A/Q286R/M158Q-FVIIa, Q286R/M298Q/K341D-FVIIa y Q286R/M298Q/H373F-FVIIa en una dosis de 3 mg/kg.

La actividad coagulante de intercambio Q286R/M298Q/Gla FIX-FVIIa, S222A/H257A/Q286R/M158Q-FVIIa, Q286R/M298Q/K341D-FVIIa y Q286R/M298Q/H373F-FVIIa en una dosis de 3 mg/kg se evaluó en el modelo de ratón de hemofilia CD-1. La inyección solo de vehículo se usó como un control. Los ratones que reciben el vehículo pierden 803 ± 92.18 µL en el ensayo de 20 minutos. Esto se redujo por el tratamiento con S222A/H257A/Q286R/M158Q-FVIIa hasta 118.6 ± 63.27 µL. El tratamiento con intercambio Q286R/M298Q/Gla FIX-FVIIa en 3 mg/kg reduce la pérdida sanguínea comparado con el grupo de vehículo desde 888.89 ± 104.76 µL hasta 171.83 ± 62.06µL. En los experimentos que evalúan Q286R/M298Q/K34 ID-FVIIa y Q286R/M298Q/H373F-FVIIa la pérdida sanguínea del grupo de vehículo fue 813.1 ± 82.66 µL. Esto se redujo hasta 39.42 ±

5.53 µL de pérdida sanguínea siguiendo el tratamiento con Q286R/M298Q/H373F-FVIIa. El Q286R/M298Q/K34 ID-FVIIa aparece para ser menos efectivo en el ensayo, resultando en pérdida sanguínea de 636.7 ± 121.6 µL.

5. Estudio de respuesta de dosis para evaluar la actividad coagulante de S222A/H257A/Q286R/M158Q-FVIIa y Q286R/M298Q/H373F-FVHa

Se evaluó la respuesta de dosis para S222A/H257A/Q286R/M158Q-FVIIa en 0.3, 0.5, 1 y 3 mg/kg. Los ratones que reciben el vehículo pierden 832.48 ± 71.70 µL en el ensayo de 20 minutos. Esto se redujo significativamente en ratones que se administraron con 3 mg/kg de S222A/H257A/Q286R/M158Q-FVIIa, hasta 118.63 ± 63.27 µL ($p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido por prueba posterior de Dunn). Reducir la dosis hasta 1 y 0.5 mg/kg resultan en una reducción importante en pérdida sanguínea (202.69 ± 77.60 µL y 366.52 ± 106.21 µL) y una dosis inferior de 0.3 mg/kg resultan en pérdida sanguínea que se compara más hasta niveles de vehículo (742.04 ± 112 µL). Una respuesta de dosis hasta Q286R/M298Q/H373F-FVIIa en 0.1, 0.3, 1 y 3 mg/kg también se evaluó y en este experimento los ratones que reciben el vehículo tienen pérdida sanguínea de 813.15 ± 82.66 µL. Esto se redujo significativamente en ratones que se trataron con 3 mg/kg de Q286R/M298Q/H373F-FVIIa, hasta 39.42 ± 5.52 µL ($p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido por prueba posterior de Dunn). Reducir la dosis hasta 1 y 0.3 mg/kg lleva a valores de pérdida sanguínea de 208.10 ± 105.12 y 508.9 ± 155.8 µL

418

respectivamente. La dosis más baja probada de 0.1 mg/kg produce pérdida sanguínea que se aproximó a los niveles de control de vehículo (733.5 ± 152.88 µL).

C. Análisis de actividad coagulante FVIIa en ratones FVIII$^{-/-}$

Un modelo de ratón de hemofilia A usando ratones deficientes en FVIII (ratones FVIII$^{-/-}$) también se usó para evaluar la actividad coagulante de polipéptidos FVIIa, usando los mismos protocolos como se describe arriba excepto que los ratones no se trataron con anticuerpos anti-FVIII.

1. Estudio de respuesta de dosis que evalúa la actividad coagulante FVIIa tipo silvestre

Se realizaron estudios de respuesta de dosis para evaluar la actividad coagulante de NovoSeven® y rhFVIIa de tipo silvestre en ratones FVIII$^{-/-}$ en 0.3, 1, 3 y 6 mg/kg. En el experimento NovoSeven®, la pérdida sanguínea en el grupo de vehículo fue 912.79 ± 38.32µL, que se redujo significativamente por tratamiento NovoSeven® en 6 y 3 mg/kg (hasta 361.74 ± 55.28 µL y 586.98 ± 60.56 µL; $p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido por prueba posterior de Dunn). Reducir la dosis hasta 1 mg/kg resulta en pérdida sanguínea de 674.84 ± 46.88 µL y en la dosis más baja probada el valor fue 801.08 ± 41.39 µL. En el experimento rhFVIIa de tipo silvestre, el grupo de control de vehículo produce pérdida sanguínea de 904.08 ± 15.38µL. Esto se redujo significativamente ($p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido por prueba posterior de Dunn) por rhFVIIa de tipo silvestre en 6 mg/kg hasta 451.04 ± 74.17 µL. Reducir la dosis

419

hasta 3 mg/kg produce un valor de pérdida sanguínea de 695.75 ± 60.50 µL mientras que reducir la dosis adicional hasta 1 y 0.3 mg/kg resulta en valores de pérdida sanguínea cercanos y en niveles de control de vehículo (846.08 ± 34.17 µL y 936.43 ± 31.39 µL, respectivamente).

2. Respuesta de dosis que evalúa la actividad coagulante Q143R-FVIIa, S222A-FVIIa, Q286R/M298Q-FVIIa y V158D/E296V/M298Q-FVIIa

El primer conjunto de experimentos prueba FVIIa humano recombinante (NovoSeven®, Novo Nordisk), V158D/E296V/M298Q-FVIIa, Q286R-FVIIa y S222A-FVIIa en 3 mg/kg. La inyección solo de vehículo se usó como un control. Los ratones que reciben solo vehículo tienen pérdida sanguínea de 942.9 ± 27.37 µL en el ensayo de 20 minutos. El tratamiento con NovoSeven® FVII, V158D/E296V/M298Q-FVIIa, Q143R-FVIIa y S222A-FVIIa reduce la pérdida sanguínea hasta 468 ± 55.9 µL, 302.38 ± 73.12 µL, 697.26 ± 92.22 µL y 675.07 ± 35.29 µL respectivamente. Q143R-FVIIa, cuando se prueba de nuevo en ratones $FVIII^{-/-}$ en 3 mg/kg, demuestra una pérdida sanguínea reducida de 754.84 ± 60.96 µL comparado con el grupo de control de vehículo (935.54 ± 51.96 µL). Cuando se evalúan en 5 mg/kg, Q143R-FVIIa produce una reducción adicional en pérdida sanguínea hasta 445.87 ± 79.62 µL comparado con el grupo de control de vehículo (960.42 ± 24.5µL).

El segundo conjunto de experimentos fueron estudios de respuesta de dosis en los cuales V158D/E296V/M298Q-FVIIa y Q286R/M298Q-FVIIa se evaluaron en 0.3, 1 y 3 mg/kg. El

tratamiento con V158D/E296V/M298Q-FVIIa en 3 mg/kg resulta en reducción importante en pérdida sanguínea (375.62 ± 74.22 µL) comparado con el control de vehículo (960.42 ± 24.5 µL; $p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido por prueba posterior de Dunn). Reducir la dosis hasta 1 y 0.3 mg/kg lleva a valores de pérdida sanguínea más cercanos a los valores de control, de 834.76 ± 54.38 µL y 841.62 ± 68.99 µL respectivamente. Un segundo experimento que evalúa un lote diferente de V158D/E296V/M298Q-FVIIa produce un valor de pérdida sanguínea del control de vehículo de 912.79 ± 38.32 µL, que se inhibió significativamente en 3 y 1 mg/kg (247.24 ± 35.17 µL y 628.30 ± 37.36 µL; $p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido por prueba posterior de Dunn). El tratamiento con una dosis inferior de V158D/E296V/M298Q-FVIIa produce pérdida sanguínea que se aproximó a los valores de control (841.85 ± 19.32 µL). En el experimento que evalúa el efecto de Q286R/M298Q-FVIIa en ratones $FVIII^{-/-}$, el grupo de vehículo produce pérdida sanguínea de 941.39 ± 35.18 µL. Esto se inhibió significativamente en una dosis de 3 mg/kg, resultando en pérdida sanguínea de 258.92 ± 59.82 µL. En dosis inferiores de 1 y 0.3 mg/kg los niveles de pérdida sanguínea producidos fueron 616.82 ± 78.43µL y 924.9 ± 38.01 µL, respectivamente.

D. Análisis de la actividad coagulante de variantes FVIIa adicionales al usar el Modelo de Hemofilia Inducido

La actividad coagulante de diversas variantes FVIIa se evaluó usando el Modelo de Hemofilia Inducido (IHM, por sus siglas en inglés) con ratones CD-1 descritos en el Ejemplo

421

6.B, de arriba. El protocolo fue el mismo como se describe arriba, excepto para la evaluación de la variante T128N/P129A-FVIIa y la variante M156Q/H224F-FVIIa, en el cual se usaron diferentes lotes (tercero y cuarto, respectivamente) de anti-FVIII humano. Para el tercer lote de FVIII anti-humano (lote 3; Affinity Biologicals, lote IG1603R1, que neutraliza la actividad de 418 ratón BU/ml) la dosis usada fue 12.17 mg/ratón (120 µl de una solución madre 101.4 mg/ml), que se administró en 18 horas antes de cortar la cola. Para el cuarto lote de FVIII anti-humano (lote 4; Affinity Biologicals, lote IG1639R1, que neutraliza la actividad de 875 ratón BU/ml) la dosis usada fue 8.04 mg/ratón (80 µl de una solución madre 100.45 mg/ml. La pérdida sanguínea se midió como se describe arriba, y se presenta a continuación en la Tabla 19 como el porcentaje de inhibición (calculado usando los valores promedio para la variante de interés y dividiendo por el grupo de vehículo), y el valor ED50 (determinado usando análisis de regresión no lineal (usando software GraphPad Prism®, GraphPad Software, Inc.), limitando la parte superior e inferior de la curva de respuesta con la pérdida sanguínea observada con animales de control normales y tratados con vehículo, respectivamente.

422

Tabla 19.

Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración quimotripsina)	Pérdida sanguínea 1HM; % de inhibición (1.5 mg/kg)	n	Pérdida sanguínea 1HM; ED50 (mg/kg)	n
TN (NovoSeven®)	TN (NovoSeven®)	61	1	0.7	1
TN	TN	59	1	0.75	1
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	78	1	0.5	1
Gla intercambio de FIX	Gla intercambio de FIX	63	1		
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	64	1		
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	86	3	0.5	3
Q286R	Q143R	76	2	0.55	2
S222A	S82A	75	1	0.45	1
H257S	H117S	50	1		
H373F	H224F	78	1		
Q366V	Q217V	64	1		
A175S	A39S	58	1		
K109N/A175S	K[109]N/A39S	60	1		
Q286R/H257A	Q143R/H117A	58	1		
Q286R/S222A	Q143R/S82A	50	1		
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	68	1		
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	85	2	0.15	2
Q286R/M298Q †	Q143R/M156Q †	89	1	0.16	2
Gla intercambio de FIX/ Q286R/M298Q	Gla intercambio de FIX/ Q143R/M156Q	83	2	0.13	1
S222A/H257A/Q286R/ M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	85	1	0.2	1
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	46	1		
S222A/H257A/Q286R/ Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	49	1		
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	88	1		
Q286R/H373F	Q143R/H224F	75	1		
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	95	1	0.15	1
M298Q/H373F	M156Q/H224F	95	1	0.21	1
Gla intercambio de FIX/S222A/Q286R	Gla intercambio de FIX/ S82A/Q143R	85	1	0.4	1
V158D/Q286R/E296V/ M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	95	1		

Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración quimotripsina)	Pérdida sanguínea 1HM; % de inhibición (1.5 mg/kg)	n	Pérdida sanguínea 1HM; ED50 (mg/kg)	n
T128N/P129A/Q286R/ H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H224F/	70	1		

423

† polipéptido FVIIa producido de células CHOX

E. Análisis de la actividad coagulante de variantes FVIIa adicionales al usar el Modelo de Hemofilia Inducido

La actividad coagulante de diversas variantes FVIIa se evaluó usando el Modelo de Hemofilia Inducido (IHM) con ratones CD-1 descritos en el Ejemplo 6.B, de arriba. El protocolo fue el mismo como se describe arriba, excepto que para estos lotes de experimentos 4 hasta 6 de anti-FVIII se usaron. Los detalles para estos lotes fueron como sigue: lote 4 (detallado arriba), para el quinto lote (lote 5; Affinity Biologicals, lote IG1593R2, que neutraliza la actividad de 255 ratón BU/ml) la dosis usada fue 12.25mg/ratón (120 µl de una solución madre 102.1 mg/ml), que se administró en 6 horas antes de cortar la cola. Para el sexto lote (lote 6; Affinity Biologicals, lote IG1703R2, que neutraliza la actividad de 685 ratón BU/ml) la dosis usada fue 8.02 mg/ratón (80 µl de una solución madre 100.2 mg/ml), que se administró a las 4pm en el día previo al experimento. La pérdida sanguínea se midió como se describe arriba, y se presenta a continuación en la Tabla 20 como el porcentaje de inhibición (calculado usando los valores promedio para la variante de interés y dividido por el grupo de vehículo), en cada caso todas las dosis se muestran con los valores de inhibición correspondientes a continuación, y el valor ED50 (determinado usando análisis de regresión no lineal (usando software GraphPad Prism®, GraphPad Software, Inc.), limitando la parte superior e inferior de la curva de

respuesta con la pérdida sanguínea observada con animales de control normales y tratados con vehículo, respectivamente. El 'n/grupo' se refiere a la cantidad de ratones por grupo mientras que la 'n' en referencia al cálculo ED50 se refiere a la cantidad de experimentos realizados con la variante.

Tabla 20.

Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración quimotripsina)	Pérdida sanguínea 1HM; % de inhibición en cada dosis			n/grupo	Pérdida sanguínea 1HM; ED50 (mg/kg)	n
		Dosis (mg/kg)					
		0.1	0.3	1			
H257A/Q286R	H117A/Q143R			53	7-10		
M298Q	M156Q	37	81	87	7-10	0.11	1
M298Q/T128N/P129A	M156Q/T[128]N/P[129]A	39	79	93	7-9	0.1	1
Q286R/T128N/P129A	Q143R/T[128]N/P[129]A	32	42	58	6-8	0.27	1
Gla intercambio de FIX/T128N/P129A /S222A/Q286R	Gla intercambio de FIX/T[128]N/P[129]A /S82A/Q143R	27	45	62	6-8	0.27	
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	33	57	89	9-10	0.15	1
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	35	57	94	8-10	0.13	1
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	32	62	95	8-9	0.14	1
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	44	65	95	9	0.09	1
Gla intercambio de FIX/Q286R/M298Q	Gla intercambio de FIX/Q143R/M156Q	35,	57	80	7-10	0.14	1
T128N/P129A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/ Q143R/M156Q	47,	83	91	9-14	0.1	1
Gla intercambio de FIX/T128N/P129A /Q286R/M298Q	Gla intercambio de FIX/T[128]N/P[129]A /Q143R/M156Q	15	71	96	7-9	0.17	1
{Gla intercambio de FIX/K43I}/Q286R/ M298Q	{Glas intercambio de FIX/K[43]I}/Q143R/ M156Q	49	65	80	7-9	0.08	1
Gla intercambio de FIX/S52A/S60A/ Q286R/M298Q/	Glas intercambio de FIX/S[52]A/S[60]A/ Q143R/M156Q/	38	71	88 †	9-10	0.11	1
{Gla intercambio FIX/K43I}/T128N/P 129A/ Q286R/M298Q	{Gla intercambio FIX/K[43]I}/T[128]N/ P[129]A/Q143R/M156Q	23	58	84	9	0.17	1
S222A/H257A/Q286R/M298Q / T128N/P129A	S82A/H117A/Q143R/M156Q/ T[128]N/P[129]A	24	71	96	7-8	0.15	1
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	41	79	96	7-8 Solo vehículo: n=17	0.1	1
T128N/P129A/ Q286R/M298Q/Q366N	T[128]N/P[129]A/ Q143R/M156Q/Q217N	40	53	84	6-8	0.09	1
{Gla intercambio FIX/K43I}/T128N/P	{Gla intercambio FIX/K[43]I}/T[128]N/	39	81	94	8-10	0.1	1

425

Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración quimotripsina)	Pérdida sanguínea 1HM; % de inhibición en cada dosis (mg/kg)			n/grupo	Pérdida sanguínea 1HM; ED50 (mg/kg)	n
		Dosis (mg/kg)					
		0.1	0.3	1			
129A/ Q286R/M298Q/Q366N/	P[129]A/Q143R/M156Q /Q217N						
T128N/P129A/Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H224F		26		7-9		
T128N/P129A/Q286R/M298Q / H373F	T[128]N/P[129]A /Q143R/M156Q/H224F	43	42	87	6-13	0.12	1
M298Q/H373F	M156Q/H224F	27	46	82	7-8	0.21	1
T128N/P129A/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/M156Q/ H224F	48	77	85 †	8-10	0.09	1
V158D/E296V/M298Q/Q286R	V21D/E154V/M156Q/Q143R	27,	61	95	7-8	0.16	1
Gla intercambio de FIX/S222A/Q286R/ T239V	Gla intercambio FIX/S82A/Q143R/T99V	30,	32	60	8-9	0.36	1
Q286R/M298Q/T239V	Q143R/M156Q/T99V	21	67	92	7	0.16	1
Gla intercambio FIX/Q286R/M298Q/ T239V	Gla intercambio de FIX/Q143R/M156Q/ T99V	16	69	90	7-9	0.17	1
T128N/P129A/T239V/ Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/ T99V/ Q143R/M156Q/	29	63	91	9	0.15	1
S222A/T239V/H257A /Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/ Q143R/M156Q/	38	63	94	7-8	0.12	1
T128N/P129A/S222A/T239V/ H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/T99V/ H117A/Q143R/M156Q	44	75	79	7-9	0.09	1
T128N/P129A/T239V/ Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/T99V/ Q143R/M156Q/H224F	51	75	88	8-10	0.08	1
V158D/T239I /E296V/M298Q	V21D/T99I /E154V/M156Q	45	48	85	7-9	0.11	1
T128N/P129A/ T239I/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/T99I/ Q143R/M156Q	20	61	82	8-10	0.18	1
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	23	52	86	8-9	0.19	1
T128N/P129A/T239I/ Q286R/M298Q/H373F/	T[128]N/P[129]A/T99I/ Q143R/M156Q/H224F	36	67	73	8-10	0.11	1
M298Q/Q366N/H373F	M156Q /Q217N/H224F	33	80	88	8-10	0.11	1

426

Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración quimotripsina)	Pérdida sanguínea 1HM; % de inhibición en cada dosis (mg/kg)			n/grupo	Pérdida sanguínea 1HM; ED50 (mg/kg)	n
		Dosis (mg/kg)					
		0.1	0.3	1			
T239V/M298Q/H373F	T99V/M156Q/H224F	50	68	84	7-9 Solo vehículo: n=16	0.07	1
T239I/M298Q/H373F	T99I/M156Q/H224F	56	74	96	9-10	0.07	1
T128N/P129A/Q286R/ M298Q/Q366N/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156 Q/ Q217N/H224F	51	87	92	7-9	0.1	1
T239V/Q286R/M298Q/Q366N	T99V/Q143R/M156Q/Q217N	45	62	80	7-9	0.08	1
T239I/Q286R/M298Q/Q366N	T99I/Q143R/M156Q/Q217N	8	34	79	8-9	0.34	1

† la dosis fue 0.6 mg/kg

Ejemplo 7

Determinación constante de la cinética Michaelis Menten de la actividad amidolítica de FVIIa en un sustrato de molécula pequeña

La actividad amidolítica de las variantes FVII puede evaluarse al medir la constante de los cinéticos Michaelis Menten del polipéptido FVIIa en el sustrato peptidilo Spectrozyme FVIIa (CH_3SO_2-D-CHA-But-Arg-pNA.AcOH). Tal ensayo puede realizarse como sigue.

El factor de tejido purificado humano lipidado (Innovin, Dade Behring, VWR Cat#68100-390) se incluye en el ensayo para proporcionar la actividad óptima de FVIIa. El complejo TF-FVIIa escinde a Spectrozyme FVIIa como un sustrato cromogénico altamente específico que libera un paranitroanilina-cromóforo (pNA), que puede vigilarse al

427

medir la absorción en 405 nm. La actividad de enzima se determina al vigilar la absorbancia en 405 nm del pNA libre generado como una función de tiempo.

Las reacciones se realizan en tres concentraciones de enzima diferentes. Para la reacción, las variantes FVIIa se diluyen primero hasta 40 nM en 1 x solución amortiguadora de ensayo directa (Tris 100 mM pH 8.4, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 5 mM, BSA al 0.01%) en un tubo 1.7 mL (tubos microcentrífugos de baja adhesión de ISC Bioexpress). La FVIIa se diluye además en la presencia de TF (Innovin, Dade Behring) al diluir hasta 2 nM en un reservorio de polipropileno de 12 pozos (Axygen) como sigue: 720 µl 5× solución amortiguadora directa (Tris 500 mM pH 8.4, NaCl 500 mM, $CaCl_2$ 25 mM, BSA al 0.05%), 180 µl FVIIa 40 nM, y 2700 µl 2×TF (solución madre 6 nM reconstituida en 10 mL de agua). La proteasa diluida se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente. La solución madre 2 nM de FVIIa se diluye además en diluciones en serie 2 veces para dar una solución madre 1 nM y 0.5 nM de proteasa, respectivamente, también en la presencia de TF. Las reacción de dilución en serie son como sigue: primero, 1800 µl de solución madre 2 nM de FVIIa/TF de arriba diluido en 360 µl 5 X solución amortiguadora directa, 900 µl 2×, y 540 µl de agua. Esta solución amortiguadora madre diluida se diluye de nuevo 1:1 en 1800 µl 1×TF en solución amortiguadora directa.

Se hace una placa de dilución del sustrato Spectrozyme FVIIa (American Diagnostica). La solución madre de Spectrozyme FVIIa se hace por reconstitución del vial 50 µmoles en agua destilada hasta 10 mM y almacena a 4°C. Dieciocho µl

128

(Spectrozyme FVIIa 10 mM) y 60 µl + 20 µl de agua (Spectrozyme FVIIa 7.5 mM) del Spectrozyme FVIIa 10 mM se agregan a paredes en dos columnas adyacentes de una placa de ensayo de polipropileno de 96 pozos (Costar). Los dos pozos se diluyen en serie 2 veces bajando cada uno de los 8 pozos de la columna respectiva para hacer una serie de concentraciones de sustrato 10× en el intervalo desde 10 mM hasta 78 µM de sustrato bajando los pozos de la primera columna y desde 7.5 mM hasta 58.6 µM hacia los pozos de la segunda columna.

Cinco µl de cada dilución de sustrato de Spectrozyme FVIIa se agrega a una placa de ensayo de área media clara de 96 pozos (Costar). Cuarenta y cinco µl de cada una de las tres diluciones FVIIa/TF se agregan a tres grupos de columnas de las diluciones en serie del sustrato. Durante esta etapa, se tiene cuidado para evitar introducir burbujas en los pozos del ensayo. Si las burbujas se introducen, pueden removerse al pinchar con una aguja limpia antes de iniciar cada ensayo. Las placas luego se mezclan por agitación. Antes del inicio del ensayo, la longitud de la trayectoria de los pozos de ensayo se mide usando un espectrofotómetro lector de placa Spectramax Gemini M5 (Molecular Devices) al tomar una lectura de punto final y usando la característica Pathcheck del software SoftMax Pro (Molecular Devices). El incremento en la absorbancia en 405 nm se mide cada 30 segundos durante una hora a 37°C.

El software SoftMax Pro se usa para convertir la velocidad de absorbancia (miliunidades/seg) a la concentración de pNA liberado (µM/seg) al usar la longitud de trayectoria y el coeficiente de extinción del grupo de partida pNA en 405 nm,

9600 M^{-1} cm^{-1}. La ecuación de conversión es como sigue: Velocidad × (1/60 × 1000) × (1/9600 × longitud de trayectoria) × 100000. Los resultados para cada concentración de proteasa se grafican usando software Graph Pad Prism con la concentración de sustrato en el eje X y las velocidades µM/seg determinadas en el eje Y. Usando software Graph Pad Prism 4 Km y Ymax se determina al fijar los datos a una ecuación Michaelis Menten como sigue:

$$Y = ((k_{cat}K_m/1000000) \times X \times [E])/(1+(X + K_m)$$

donde; X es la concentración de sustrato (µM)

Y es la actividad de enzima (µM/seg)

$k_{cat}K_m$ es la constante de especificidad (M^{-1} seg^{-1})

K_m es la constante Michaelis (µM)

E es la concentración de enzima (µM)

Se establecieron los valores iniciales de E= 1, Km = X en 0.5 × Y max y $k_{cat}K_m$ = 1000.

Ejemplo 8

Evaluación de la potencia de la interacción entre variantes FVIIa y TFPI

La potencia de la interacción entre polipéptidos FVIIa, tal como aquellos proporcionados en la presente, y TFPI, puede evaluarse usando uno o más ensayos. En un ejemplo, la potencia de la interacción entre TFPI y un complejo FVIIa/TF se evalúa al medir el nivel de inhibición de varias concentraciones de TFPI en la actividad catalítica de un FVIIa/TF hacia un sustrato, Spectrazyme Vila. En otro ejemplo, puede usarse un ensayo de resonancia de plasmón de superficie de alto desempeño

479

(SPR, por sus siglas en inglés).

A. Determinación del IC_{50} para Inhibición TFPI de FVIIa/TF

La potencia de la interacción entre TFPI y el complejo FVIIa/TF se evaluó al medir el nivel de inhibición de varias concentraciones de TFPI en la actividad catalítica de un FVIIa/TF hacia un sustrato, Spectrazyme Vila. La concentración de TFPI que se requirió para inhibición al 50% (IC_{50}) se calculó para cada variante FVII, y un estándar FVIIa.

Una placa de ensayo de área media clara de 96 pozos (Nunc) se pretrató al agregar 150 µl/pozo de 1 × solución amortiguadora de placa (Tris 100 mM pH 8.4, NaCl 100 mM, BSA al 0.01%, Tween-20 al 0.01%) a cada pozo e incubar la placa a 37°C durante un mínimo de 1 hora. La solución amortiguadora se removió completamente al agitar y aplicar tinción a la placa y centrifugar la placa al revés para remover la solución amortiguadora restante. La placa se secó con aire durante 1 hora, y almacenó a temperatura ambiente (TA).

En un tubo microcentrífugo de 1.7 ml (tubo microcentrífugo de baja adhesión de ISC Bioexpress), una mezcla de FVIIa/TF se preparó en un volumen total de 450 µl al mezclar 9 µl de FVIIa 250 nM (American Diagnostica, FVIIa de tipo silvestre o una variante respectiva para probarse) se mezcló con 337.5 µl de 2× TF (Innovin; Dade Behring; producto liofilizado resuspendido en agua destilada 10 mL para generar 2X TF, que aproximadamente iguala 7 nM de TF lipidado), 90 µl 5× solución amortiguadora de ensayo (Tris 500 mM pH 8.4, NaCl 500 mM, $CaCl_2$ 25 mM, BSA al 0.05%) y 13.5 µl de agua, resultando en una solución que

437

contiene FVIIa 5 nM y TF 5.2 nM. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir que los componentes se formen en complejo. A cada pozo de 2 columnas en la placa de ensayo de área media clara de 96 pozos pretratadas, 25 µl de la mezcla FVIIa/sTF respectiva se agregó y la placa se cubrió para prevenir la evaporación.

TFPI Recombinante Humano (R&D Systems) se disolvió inicialmente en 33 µl glicerol al 50% (v/v) para hacer una solución madre 10 µM para almacenamiento a -20°C. La solución madre TFPI se diluyó además hasta 1.5 µM en una solución amortiguadora final 1× (Tris 100 mM pH 8.4, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 5 mM, BSA al 0.01%) en una placa de almacenamiento de polipropileno como sigue: para cada proteasa probada, 87.5 µl de una solución 1.5 µM de TFPI se hizo al mezclar 13.1 µl 10 µM TFPI con 17.5 µl 5× de solución amortiguadora de ensayo y 56.9 µl de agua destilada. Se hicieron diluciones en serie 3 veces de la solución TFPI en 1× solución amortiguadora de ensayo al mezclar 27.5 µl TFPI en 55 µl 1× de solución amortiguadora de ensayo, de manera que las soluciones que contienen 750 nM, 250 nM, 83.3 nM, 27.8 nM, 9.26 nM, 3.1 nM, y 1.03 nM de TFPI se generaron. El pozo final de las series contiene solamente 1× de solución amortiguadora como un control.

Veinticinco µl de cada dilución de TFPI se agregó a 2 pozos (esto es en duplicado) de 2 columnas de la placa de ensayo de área media clara de 96 pozos que contienen la mezcla FVIIa/TF, de manera que la mezcla de proteasa se procesó por ensayo en duplicado con cada dilución TFPI. Una solución de 1× de solución amortiguadora de ensayo sin TFPI también se agregó

432

a 2 pozos que contienen la mezcla FVIIa/TF como un control negativo. La placa se agitó brevemente y luego centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos antes de la incubación a 37°C durante 1.5 horas.

Una solución madre de Spectrazyme Vila (American Diagnostica) se preparó al reconstituir 50 µmoles en 5 ml de agua destilada hasta 10 mM y almacenar a 4°C hasta su uso. Inmediatamente antes de su uso, la solución se diluyó hasta 600 µM en agua destilada. Después de la incubación de la placa de ensayo de arriba, 10 µl del Spectrazyme Vila diluido se agregó a cada pozo de la placa de ensayo. Las reacciones se mezclaron y la placa se incubó a 37°C. El incremento en absorbancia a 405 nm se midió cada 30 segundos durante una hora a 37°C, y la velocidad de absorbancia se calcularon usando software SoftMax Pro (Molecular Devices).

Para determinar el grado de inhibición por TFPI, las velocidades de absorbancia de las reacciones de proteasa que contienen TFPI se dividieron primero por la velocidad de absorbancia de reacciones que no contienen TFPI (la muestra de control) para obtener la actividad fraccional, y el $\log_{10}$ de cada concentración TFPI se determinó. Usando Software GraphPad Prism, el $\log_{10}$ [TFPI] se graficó contra la actividad fraccional para cada proteasa, y una curva de respuesta de dosis se generó con un ajuste de curva que asume la parte superior e inferior de los datos de la actividad se fijan en 1 y 0, respectivamente. El software se usó para determinar la inhibición TFPI como tanto el valor log IC_{50} (pIC_{50}), y el IC_{50} absoluto (inhibición TFPI en nM) para cada proteasa, y se

473

determinó su promedio y desviación estándar.

El nivel de inhibición de TFPI de cada una de las variantes FVIIa en complejo con TF lipidado (Innovin; Dade Behring) se determinó y expresó como el incremento en veces de resistencia TFPI comparado con FVIIa de tipo silvestre (Tabla 21).

Tabla 21. Inhibición de variantes FVIIa por TFPI

Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Resistencia de veces TFPI
tipo natural	tipo natural	1.0
A292N/A294S	A150N/A152S	2.4
A175S	A39S	1.5
K109N	K[109]N	0.7
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	1.1
A122N/G124S/E394N/P395A/R396S	A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/ R247S	1.0

B. Separación por exclusión de resonancia de plasmón de superficie (SPR) de variantes FVIIa para resistencia a TFPI

La resistencia relativa de varias variantes FVIIa para la inhibición por TFPI soluble recombinante humano se evaluó usando un ensayo de resonancia de plasmón de superficie de alto desempeño (SPR) con el instrumento Biacore T100. La resistencia relativa de variantes FVIIa para la inhibición por TFPI se evaluó por la medición de la cantidad relativa de variante FVIIa enlazada a TFPI soluble inmovilizado en un chip de sensor Biacore CM5 comparado con la cantidad de FVIIa de tipo silvestre enlazado posterior a un tiempo de inyección estandarizado y concentración de proteasa.

Para cada experimento, el TFPI soluble (R&D Systems) se inmovilizó a un chip de sensor Biacore CM5 Series S de 4 células

de flujo nuevo (GE Healthcare) usando el protocolo de acoplamiento de amina disponible dentro del Software de control Biacore T-100 (GE Healthcare) y los reactivos proporcionados con el Kit de Acoplamiento de Amina (GE Healthcare). Todas las cuatro células de flujo disponibles se utilizaron para inmovilización de dos densidades diferentes de TFPI y albúmina de suero de bovino (BSA, por sus siglas en inglés), que sirven como un agente de bloqueo en las células de referencia. BSA se diluyó hasta 5 µg/mL en acetato de sodio (pH 4.0) e inmovilizó en 1 y 3 células de flujo en 1000 y 2000 unidades de respuesta (RU), respectivamente. Para inmovilización TFPI, TFPI soluble liofilizado (10 µg) se volvió a suspender en 100 µL de 1× de solución amortiguadora de acoplamiento (Hepes 30 mM, NaCl 135 mM, EDTA 1 raM, Tween-20 al 0.01 %, pH 7.4) a una concentración de 0.1 mg/mL. Un total de 20 µL de 0.1 mg/mL TFPI como se diluye hasta 10 µg/mL en acetato de sodio pH 4.0 para inmovilización hasta 2 y 4 células de flujo en 1000 y 2000 RU, respectivamente. La solución amortiguadora de acoplamiento se usó como la solución amortiguadora de corrida durante las etapas de inmovilización. Cada muestra de FVIIa se preparó en una concentración final de 320 nM en 1× solución amortiguadora de corrida (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 5 mM, PEG 8000 al 0.1%, BSA al 0.1%, Tween-20 al 0.01%, pH 7.4) que contiene sTF 620 nM (Factor de Coagulación Humano III; R&D Systems). Generalmente, cada variante FVIIa se diluyó 10 veces en 1× ^{de} Solución amortiguadora de Corrida antes de la dilución final de 320 nM. Los complejos FVIIa/sTF se prepararon en un volumen final de 120 µL en duplicado permitiendo hasta 48 variantes FVIIa únicas para cargarse en una placa de almacenamiento de 96 pozos y

435

000405

evaluarse con inyecciones en duplicado en una corrida sencilla. El complejo FVIIa/sTF se incubó a TA durante 10-15 min antes del inicio de la primera inyección de muestra.

Un método de análisis de enlace estandarizado se creó dentro del Software de Control Biacore (GE Healthcare) en el cual cada replicado FVIIa se inyecctó durante 180 segundos de tiempo de asociación seguido por un tiempo corto de 60 segundos de disociación en una velocidad de flujo de 10 µL/min. La regeneración del chip de sensor seguido de la fase de disociación durante 30 segundos con glicina 10 mM, NaCl 500 mM, pH 3.0 y luego un periodo de estabilización de 60 segundos con 1X de Solución amortiguadora de Corrida en la misma velocidad de flujo 10 µL/min. Dos puntos de referencia del ensayo se registran para cada corrida y análisis de datos posteriores, unos 5 segundos antes de la conclusión de la fase de asociación (enlace) y un segundo reporte 5 segundos antes de la conclusión de la fase de disociación (disociación). Antes de iniciar un ensayo completo, el chip de sensor se probó con una inyección sencilla de 320 nM de FVIIa/sTF de tipo silvestre durante 180 segundos, que deberá dar una respuesta de aproximadamente 400-450 RU y 750-850 RU para enlazar a células de flujo 2 (1000 RU) y 4 (200 RU), respectivamente.

El análisis de datos se realizó primero con el Software de Evaluacion Biacore T100 (GE Healthcare) para inspeccionar los parámetros de validación del ensayo, que incluye verificar que el enlace a la célula de referencia sea mínimo, desviación de la línea base y el enlace de inyecciones blancas de control (solución amortiguadora de corrida). Las tablas de datos se generaron dentro de esta solicitud que indican la cantidad de enlace variante FVIIa

(en RU) en tanto el punto de reporte de enlace y el punto de reporte de disociación. Las tablas de datos se exportaron posteriormente para análisis adicional dentro del ambiente de la hoja de cálculo de Microsoft Excel. Los puntos de datos naturales (enlace de RU) se corrigieron para enlace de control para el chip de sensor y luego una relación de la cantidad de enlace FVIIa de tipo silvestre (en RU) a la cantidad de enlace variante FVIIa (en RU) se tomó para cada parámetro y reportó como Enlace (p/variante) y Disociación (p/variante). La Tabla 22 presenta los resultados del estudio. La resistencia a la inhibición TFPI se refleja como un incremento en la relación para uno o ambos de los parámetros evaluados. Por ejemplo, un valor de Enlace (p/variante) o Disociación (p/variante) de 20 para una variante FVIIa particular indica que tal variante es 20 veces más resistente a la inhibición TFPI que FVIIa de tipo silvestre. Diversas variantes muestran resistencia incrementada para la inhibición TFPI. Por ejemplo, las variantes que contienen la mutación K341D (numeración de FVII maduro) tal como Q286R/M298Q/K341D-FVIIa, Q286R/K34 ID-FVIIa y M298Q/K34 ID-FVIIa, tienen relaciones que indican resistencia importante a TFPI (mayor que 40-150 veces). En algunos casos, la velocidad de disociación se afectó más que la velocidad de asociación.

Tabla 22. Resistencia de variantes FVIIa para la inhibición por TFPI

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ensayo de resistencia TFPI dependiente de TF			
		Células 293-F		Células BHK-21	
		Enlace (p/ variante)	Disociación (p/ variante)	Enlace (p/ variante)	Disociación (p/ variante)
TN	TN	1.0	1.0	1.0	1.0
Q286R	Q143R	2.2	1.9	3.7	3.4
A292N/A294S	A150N/A152S	2.6	2.2		
A175S	A39S	1.6	1.4		
K109N	K[109]N	0.8	0.7		
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	1.2	1.1		
A122N/G124S/ E394N/P395A/R396S	A[122]N/G[124]S/E245N/P246A/R247S	1.1	1.0		
S119N/L121S	S[119]N/L[121]S			1.2	1.3
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A			1.1	1.2
Q286R/S222A/Gla intercambio FIX	Q143R/S82A/Gla intercambio FIX	1.9	1.7		
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q			2.0	1.8
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q	3.1	3.5	3.0	3.5
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE	4.6	4.1	2.4	2.1
T239V	T99V	1.4	1.4	1.1	1.1
H257A/M298Q	H117A/M156Q			2.4	2.7
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q			1.6	1.4
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	4.2	3.5	3.5	2.9
K109N/A175S	K[109]N/A39S			3.4	3.2
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V			1.2	1.2
Q366I	Q217I	0.6	0.5		
K197E/M298Q	K60aE/M156Q	2.6	2.3		
Q286R/M298Q/K341D	Q143R/M156Q/K192D	33.6	182.3		
Q286R/K341D	Q143R/K192D	29.8	281.8		
M298Q/K341D	M156Q/K192D	146.8	196.5		
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	2.8	2.7		
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	2.7	2.6		
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	3.0	2.9		

Ejemplo 9

Análisis farmacocinético de polipéptidos FVIIa

Las propiedades farmacocinéticas de los polipéptidos FVIIa se evaluaron al medir la cantidad de Factor VIIa humano en plasma de ratón. Dos ensayos pueden usarse para cuantificar FVIIa en plasma. Un ELISA puede usarse para cuantificar la proteína FVIIa total en plasma de ratón y un ensayo de coagulación dependiente de FVIIa (FVIIa:C) usado para cuantificar la actividad coagulante de los polipéptidos FVIIa

000408

en plasma.

A. Administración de polipéptidos FVIIa para ratones

Los polipéptidos FVIIa modificados y la proteína FVIIa humano recombinante no modificado (rhFVIIa) (NovoSeven®, Novo Nordisk) se evaluaron en estudios farmacocinéticos. Para cada estudio, 18 ratones CD-1 machos se inyectaron con una dosis de bolo intravenosa (0.1-3.0 mg/kg, dependiendo del estudio) de rFVIIa. En 5, 15, 30, 60, 120, y 240 minutos después de la inyección, tres ratones de cada protocolo de inyección se les aplicaron la eutanasia usando asfixia CO_2 y aproximadamente 1.0 mL de sangre se retiró en un jeringa de 1.0 mL por medio de una punción cardiaca percutánea. Cada jeringa se pre-cargó con suficiente citrato de sodio para alcanzar una concentración final de 3.2% en 1 mL de sangre. Las muestras de sangre luego se centrifugaron a 9000 rpm durante 8 min a 4°C. El plasma se removió en tubos de 1.5 ml individuales etiquetados (Eppendorf), congelado inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C. Adicionalmente, un ratón por experimento se inyectó con solo vehículo (simulado) y el plasma de este ratón se usó para determinación de actividad FVIIa de respaldo.

B. Ensayo ELISA

Un kit comercialmente disponible, ELISA Factor VII IMUBIND® (American Diagnostica) se usó para detectar proteína FVII en suero por ELISA. Este kit emplea una placa pre-cubierta con un anticuerpo anti-FVII/FVIIa para capturar la proteína, y un anticuerpo anti-FVII biotinilado para detección a través de

000439

una peroxidasa de raíz de rábano etiquetada con estreptavidina. El kit se usó de acuerdo con la dirección de los fabricantes con las siguientes excepciones: primero, la curva estándar se ha reducido para asegurar un intervalo lineal sobre el intervalo de concentración completo y espaciando las concentraciones de 0.88 ng/ml hasta 10 ng/ml; segundo, la variante FVIIa purificada por sí misma se usó para la curva estándar en vez de el estándar FVII proporcionado con el kit debido a las diferencias en la afinidad de anticuerpo. Los experimentos indican que el complejo de FVIIa con anti-trombina III (ATIII), un inhibidor de plasma potencial de FVIIa, se detecta en 75% del nivel de la proteasa libre, asegurando que el ensayo puede detectar el FVIIa total en la muestra de plasma en tanto las formas activas como inactivas. Brevemente, las muestras de plasma se congelaron a temperatura ambiente y diluyeron 10 veces en solución amortiguadora de muestra (PBS + Triton X-100 al 0.1% + BSA al 1.0%) luego se diluyeron en serie 5.5 veces durante cuatro diluciones. Las cuatro muestras diluidas se diluyeron 2 veces en la placa ELISA para diluciones de muestra finales de 20, 110, 605 y 3327.5 veces. Estas cuatro diluciones de plasma de ratón cubren un intervalo de concentraciones de proteasa de 33,000 ng/ml hasta 20 ng/ml. Cada muestra se midió en dos placas de ensayos separados, y aquellas mediciones dentro del intervalo de la curva estándar se usaron para calcular la concentración de la variante FVIIa en la muestra de plasma

C. Ensayo de Coagulación

440

Un kit comercialmente disponible (STACLOT FVIIa-rTF, Diagnostica Stago, Parsippany, NJ) se usó como el ensayo de coagulación. Para determinar la actividad coagulante de los polipéptidos FVIIa activos, las muestras de plasma se procesaron por ensayo usando un ensayo de coagulación dependiente de FVIIa (FVIIa:C). El ensayo se realizó usando reactivos e instrucciones proporcionadas en un kit comercial y el tiempo de coagulación se mide usando un instrumento de detección de coagulación electromecánico (STArt4, Diagnostica Stago, Parsippany, NJ). El kit se usó de acuerdo a la dirección de los fabricantes con las siguientes excepciones: primero, la variante FVIIa purificada por si misma se usó para la curva estándar en vez de el estándar rhFVIIa proporcionado con el kit; segundo, los siguientes reactivos comerciales de volumen se usaron para estudios de separación por exclusión farmacocinéticos y dan resultados comparables con los reactivos del kit: factor de tejido soluble (CalBioChem, La Jolla, Ca) y mezcla de fosfolípido sintético (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), solución amortiguadora TBSA (Tris-NaCl, pH 7.5 con BSA al 1%; DiaPharma, West Chester, Ohio), y solución de cloruro de calcio 25 µM (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ).

El ensayo de coagulación se realizó como sigue. Las muestras de plasma congeladas se descongelaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 45 min y luego se diluyeron 1:5000 en solución amortiguadora. Cincuenta µl del plasma diluido se combina con 50 µL de plasma humano deficiente del Factor VII y 50 µL del factor de tejido relipidado y preincubado durante 180 segundos. Después de la preincubación,

441

50 µL de solución de cloruro de calcio (25 µM) se agregó para iniciar la coagulación. El tiempo de coagulación se determinó usando detección de coagulación electromecánico. Cada muestra de plasma se procesó por ensayo en duplicado. El sistema se calibró al construir una curva estándar usando el tiempo de coagulación de diluciones en serie de la solución amortiguadora que contiene una cantidad conocida de la variante FVIIa específica que se procesa por ensayo. Las concentraciones FVIIa en muestras de plasma de ratón se calcularon de la porción lineal de la curva estándar de tiempo de coagulación log FVIIa contra Log. La capacidad de las muestras de plasma para inducir coagulación en plasma deficiente de Factor VII se reportó como ng FVIIa/mL de plasma de ratón después de la sustracción de respaldo de FVIIa de tipo silvestre endógeno en plasma de ratones tratados simulados.

La vida media de cada proteína FVII se determinó de forma rutinaria al hacer un ajuste convencional del log natural de la actividad para una línea recta, y medir el tiempo tomado para la actividad de proteínas FVIIa para reducirse por la mitad. Para proteínas FVII con descomposición exponencial múltiple, la vida media se determinó de la porción terminal del plasma log VS perfil de tiempo. Los parámetros farmacocinéticos adicionales se calcularon como sigue: Plasma AUC_{0-inf}/Dosis (calculado como $[AUC_{(0-t)} + Ct/(\ln 2/T_{1/2})]$, donde t es el último punto de tiempo con concentración de plasma medible del polipéptido FVIIa dividido por la dosis IV (mg/kg)); vida media (la vida media del polipéptido FVIIa durante la fase terminal de concentración FVIIa de plasma contra perfil de tiempo; $T_{1/2}$

se calcula como -ln2 dividido por la inclinación negativa durante la fase terminal del grupo lineal log de la concentración FVIIa de plasma contra curva de tiempo); $MRT_{0\text{-último}}$ (tiempo medio del polipéptido FVIIa reside en el cuerpo; calculado como $AUMC_{0\text{-último}}/AUC_{0\text{-último}}$, donde $AUMC_{0\text{-último}}$ es el área total bajo la primera curva del momento contra tiempo (concentración · tiempo contra curva de tiempo), y se calcula por la regla de trapezoide lineal); Cl (depuración sistémica; calculada como $Dosis/AUC_{0\text{-inf}}$); y V_d (volumen de distribución con base en la constante de eliminación terminal e (β); calculado como $[Cl/(\ln 2/T_{1/2})]$).

D. Propiedades farmacocinéticas de variantes FVIIa

Usando el protocolo FVIIa:C descrito arriba, las propiedades farmacocinéticas de FVIIa de tipo silvestre y variantes FVIIa se evaluaron con base en la activada de coagulación en el plasma. Los resultados se establecen en la Tabla 23. Diversas variantes FVIIa muestran parámetros farmacocinéticos mejorados comparados con FVIIa de tipo silvestre.

Tabla 23. Parámetros Farmacocinéticos de Ratón de Variantes FVIIa

Mutación (numeración de FVII madruo)	Dosis IV (mg/kg)	Plasma AUC0-inf (ug.min/mL) /Dosis	Vida media (min)	MRT0 -último (min)	Cl (mL/min/kg)	Vd (mL/kg)	N
NovoSeven® RT FVIIa	0.1	1165	37	50	0.9	46	1
NovoSeven® FVIIa	0.1	741	30	31	1.4	58	1
NovoSeven® FVIIa	1.0	1156	36	41	1.7	89	1
WT	0.1	686	37	37	1.8	92	6
WT	1.0	798	50	57	1.5	118	2
P257insGGGSCSFGRGDIRNVC	0.1	391	32	32	2.3	108	1
T128N/P129A	0.1	1392	57	43	0.8	64	2
S52A	0.1	594	51	58	1.6	118	1
K109N	0.1	951	50	40	1.1	75	1
A51N	0.1	270	33	32	3.7	174	1
S52A/S60A	0.05	460	25	29	2.2	78	1
S52A/S60A	0.1	408	17	34	2.5	61	1
M298Q	0.1	258	76	33	4.9	443	2
T128N/P129A/M298Q	0.1	495	26	28	2.0	75	1
V158D/E296V/M298Q	0.05	72	13	10	13.9	258	1
V158D/E296V/M298Q	0.1	44	16(á), 45(â)	20	22.8	1465	1
V158D/E296V/M298Q	1.0	39	7	13	26.6	979	2
V158D/E296V/M298Q	3.0	22	7.7á	7.9	45.6	506	1
V158D/E296V/M298Q	6.0	48	43	45	20.8	1305	1
T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q	0.1	125	11	14	8.0	122	1
S52A/S60A/V158D/E296V/M298Q	0.1	47	15	11	21.4	450	1
Q286R	0.1	181	55	59	5.5	439	1
Q286R	0.3	460	41.7	76	1.8	110	1
Q286R	1.0	1256	67	68	0.8	80	2
T128N/P129A/Q286R	0.1	2443	96	82	0.4	56	1
S52A/S60A/Q286R	0.1	1565	43	60	0.6	55	1
Gla intercambio FIX	0.1	207	20	22	4.9	140	2
K341D	0.1	2817	106	114	0.1	22	1
S222A	0.1	189	32	33	5.3	248	1
S222A	1.0	139	30	33	3.8	293	1
T128N/P129A/S222A	0.1	422	28.4(á), 71(â)	58	2.4	244	1
S52A/S60A/S222A	0.1	270	45	38	3.7	243	1
H257A	0.1	595	31	30	1.7	76	1
H257S	0.1	1015	59	62	1.0	84	1
H257S	0.75	816	50	62	1.2	85	1
Q366V	0.1	19	14	11	51.6	1060	1
Gla intercambio FIX/Q366V	0.1	157	11	7.0	6.4	107	1

Mutación (numeración de FVII maduro)	Dosis IV (mg/kg)	Plasma AUC0-inf (ug.min/mL) /Dosis	Vida media (min)	MRT0 -último (min)	Cl (mL/min/kg)	Vd (mL/kg)	N
A122N/G124S/E394N/P395A/ R396S	0.1	1089	63	45	0.9	84	1
G318N	1.0	568	95	56	1.8	242	1
A175S	0.1	2081	111	85	0.5	76	2
K109N/A175S	0.1	1280	183	51	0.8	207	1
S119N/L121S/A175S	0.1	2460	102	50	0.4	60	1
T128N/P129A/A175S	0.1	2770	83	48	0.4	43	1
A122N/G124S/A175S	0.1	3240	91	50	0.3	40	1
A122N/G124S	0.1	679	52.9	42	1.1	87	1
H257A/Q286R	0.1	1848	56.8	73	0.5	44	1
S222A/Q286R	0.1	861	30	38	1.5	97	2
Gla intercambio FIX/S222A/Q286R	1.0	415	39	42	2.4	136	1
Gla intercambio FIX/T128N/P129A /S222A/Q286R	0.1	929	55	59	1.1	86	1
S222A/H257A/Q286R	0.1	976	56	42	1.0	83	1
Q286R/M298Q	0.055	1198	40	44	0.8	49	1
Q286R/M298Q	0.1	605	35	42	1.9	94	6
Q286R/M298Q	1.0	363	29	36	2.8	116	1
Gla intercambio FIX/Q286R/M298Q	0.1	231	26	20	4.9	194	3
T128N/P129A/Q286R/M298Q	0.1	1571	41	60	0.6	38	1
T[128]N/P[129]A/ Q286R/M298Q	0.1	1326	42.3	50	0.8	47	1
Gla intercambio FIX/T128N/P129A/ Q286R/M298Q	0.1	427	30	32	2.3	101	1
{Gla intercambio FIX/E[40]L}/ Q286R/M298Q	0.1	386	53	43	2.6	198	1
{Gla intercambio FIX/K[43]I}/ Q286R/M298Q	0.1	439	85	47	2.3	280	1
{Gla intercambio FIX/Q[44]S}/ Q286R/M298Q	0.1	291	14	24	3.4	150	1
{Gla intercambio FIX/M[19]K}/ Q286R/M298Q	0.1	648	14 (á), 75 (ã)	43	1.5	32	1
S52A/S60A/ Q286R/M298Q	0.1	374	32	34	2.7	122	1
Gla intercambio FIX/S52A/S60A/ Q286R/M298Q	0.1	256	19	18	3.9	107	1
{Gla intercambio FIX/K[43]I}/ T128N/P129A/Q286R/M298Q	0.1	154	18	17	6.5	166	1
S222A/M298Q	0.1	72	17	12	13.9	332	1
S222A/H257A/Q286R/M298 Q	0.1	93	33	30	10.8	517	1
T128N/P129A/S222A/H257A/ Q286R/M2986Q	0.1	770	38	45	1.3	72	1
S52A/S60A/S222A/H257A/Q 28R/M2986Q	0.1	469	26	28	2.1	78	1
A175S/Q286R/Q366V	0.1	353	28.9	23	2.8	118	1
Q286R/M298Q/K341D	0.1	219	23	20	4.6	151	1
M298Q/K341D	0.1	2430	78	76	0.4	46	1
Q286R/M298Q/Q366N	0.1	569	29	32	1.8	74	1
T128N/P129A/Q286R/M298Q /Q366N	0.1	1897	50	58	0.5	38	1
{Gla intercambio FIX	0.1	257	10(á),	20	3.9	163	1

Mutación (numeración de FVII maduro)	Dosis IV (mg/kg)	Plasma AUC0-inf (ug.min/mL) /Dosis	Vida media (min)	MRT0 -último (min)	Cl (mL/min/kg)	Vd (mL/kg)	N
K[43]I}/Q286R/M298Q/Q366N			28(â)				
(Gla intercambio FIX K[43]I}/ T128N/P129A/Q286R/M298Q /Q366N	0.1	393	24	27	2.5	89	1
T128N/P129A/Q286R/H373F	0.1	1467	59	62	0.9	74	1
Q286R/M298Q/H373F	0.1	466	28	23	2.2	87	1
T128N/P129A/Q286R/M298Q /H373F	0.1	597	27(á), 67(â)	51	1.6	153	1
T128N/P129A/M298Q/H373F	0.1	307	7(á), 27(â)	23	3.3	126	1
V158D/Q286R/E296V/M298Q	0.1	172	14	36	5.8	535	1
S222A/T239V	0.1	127	47	39	7.9	535	1
Gla intercambio FIX/S222A /T239V/Q286R	0.1	460	34	33	2.2	108	1
T239V/Q286R/M298Q	0.1	398	28(á),71(â)	60	2.5	258	1
Gla intercambio FIX/T239V/ Q286R/M298Q	0.1	365	13(á),56(â)	29	2.7	220	1
T128N/P129A/T239V/Q286R/ M298Q	0.1	914	38	36	1.1	60	1
S222A/T239V/H257A/Q286R /M298Q	0.1	181	28	31	5.5	225	1
T128N/P129A/S222A/T239V/ H257A/ Q286R/M298Q	0.1	564	27	30	1.8	70	1
T239V/Q286R/H373F	0.1	385	72	54	2.6	269	1
T239V/Q286R/M298Q/H373F	0.1	149	36	23	6.7	353	1
T128N/P129A/T239V/Q286R/ M298Q/H373F	0.1	345	27	27	2.9	113	1
V158D/T239I/E296V/M298Q	0.1	370	14(á),70(â)	50	2.7	273	1
T239I/Q286R	0.1	1820	85	76	0.6	68	1
S222A/T239I	0.1	1300	6(á), 81(â)	69	0.8	90	1
Gla intercambio FIX /S222A/T239I/Q286R	0.1	1073	70	66	0.9	94	1
T239I/Q286R/M298Q	0.1	1029	27(á),60(â)	62	1.0	84	1
Gla intercambio FIX T239I/Q286R/M298Q	0.1	1269	54	62	0.8	61	1
T128N/P129A/T239I/Q286R/ M298Q	0.1	2105	82	74	0.5	56	1
S222A/T239I/H257A/Q286R/ M298Q	0.1	1212	31(á), 79(â)	60	0.8	101	1
T239I/Q286R/H373F	0.1	1841	30(á), 85(â)	69	0.5	62	1
V158D/T239V/E296V/ M296Q	0.1	184	24(á), 134(â)	78	5.4	1053	1
T239V/Q286R	0.1	1522	29(á), 72(â)	68	0.7	68	1

446

Mutación (numeración de FVII maduro)	Dosis IV (mg/kg)	Plasma AUC0-inf (ug.min/mL) /Dosis	Vida media (min)	MRT0 -último (min)	Cl (mL/min/kg)	Vd (mL/kg)	N
T239V/Q286R/M298Q/H373F	0.1	950	36	61	1.1	55	1
T239V/Q286R/M298Q/H373F	0.1	806	32	56	1.3	57	2
T239V/Q286R/M298Q/H373F	0.1	663	27	52	1.5	59	1
T239V/Q286R/M298Q/H373F	0.1	1350	53	62	0.7	57	1
S222A/H257S/Q286R/M298Q	0.1	814	33	31	1.2	59	1
H257S/Q286R/M298Q/H373F	0.1	297	34	34	3.4	163	1
S222A/Q286R/M298Q/H373F	0.1	106	35	23	9.4	478	1
Gla intercambio FIX /S222A/ Q286R/M298Q/H373F	0.1	104	9.1(á),17 (â)	13	9.7	242	1
S222A/Q286R/M298Q	0.1	347	24	26	2.9	102	1
Gla intercambio FIX /S222A/ Q286R/M298Q	0.1	263	11	13	3.8	62	1
T128N/P129A/A175S/Q366V	0.1	2196	52(á), 85(â)	78	0.5	56	1
A122N/G124S/A175S/Q366V	0.1	2148	92	81	0.5	62	1
T128N/P129A/A175S/S222A	0.1	4248	122	88	0.2	41	1
A122N/G124S/A175S/S222A	0.1	3316	102	83	0.3	44	1
T128N/P129A/A175S/Q286R	0.1	6160	151	94	0.2	35	1
A122N/G124S/A175S/Q286R	0.1	4097	139	93	0.2	49	1
Gla intercambio FIX /S222A/Q286R/H373F	0.1	480	26	30	2.1	79	1
V258D/E296V/M298Q/H373F	0.1	90	8.7(á), 20(â)	14	11.1	321	1
H257A/Q286R/M298Q	0.1	1029	42	48	1.0	59	1
Gla intercambio FIX /T128N/ P129A/A175S/S222A/Q286R	0.1	2787	38(á), 134(â)	88	0.4	69	1
Gla intercambio FIX /A122N/ G124S/A175S/S222A/Q286R	0.1	3492	148	95	0.3	61	1
T128N/P129A/A175S/Q286R/ M298Q	0.1	5120	171	96	0.2	48	1
A122N/G124S/ A175S/Q286R/M298Q	0.1	3681	154	92	0.3	61	1
T128N/P129A/A175S/S222A/ H257A/Q286R/M298Q	0.1	3140	113	87	0.3	52	1
A122N/G124S/A175S/S222A /H257A/Q286R/M298Q	0.1	2659	37.(á),130(â)	85	0.4	70	1
T128N/P129A/A175S/Q286R/ M298Q/H373F	0.1	3580	118	88	0.3	48	1
A122N/G124S/A175S/Q286R/ M298Q/H373F	0.1	3148	105	84	0.3	48	1
V158D/Q286R/E296V/M298 Q/H373F	0.1	124	20	17	8.1	237	1
M298Q/H373F/Q366N	0.1	169	8	8.2	5.9	69	1
T239V/M298Q/H373F	0.1	110	18	16	9.1	235	1
T239I/M298Q/H373F	0.1	562	26	28	1.8	66	1
T128N/P129A/Q286R/M298Q /Q366N/H373F	0.1	607	29	30	1.6	69	1
T239V/Q286R/M298Q/ Q366N	0.1	729	29	30	1.4	57	1
T239I/Q286R/M298Q/Q366N	0.1	1548	72	73	0.6	67	1

α = vida media alfa, medición de la vida media de distribución

β = vida media beta, medición de la vida media de eliminación

La Tabla 24 establece los resultados del estudio usando los siguientes parámetros farmacocinéticos: % de recuperación (*in vivo*) (la concentración de plasma medida de FVIIa en 5 minutos después de la dosis (primer punto de tiempo) dividido por la concentración de plasma FVIIa máxima teórica (con base en la masa FVIIa administrada y volumen de sangre total teórica) veces 100%); % de recuperación (*in vitro*)(la concentración FVIIa medida en plasma inoculado con una cantidad conocida de FVIIa dividido por la concentración de plasma FVIIa teórica (con base en la cantidad de masa FVIIa inoculada en un volumen de plasma conocido) veces 100%); Actividad/Dosis AUC* (Dependiente de TF) (el plasma AUC/Dosis multiplicado por la Actividad Indirecta Dependiente de TF (ver Tabla 15, de arriba); Mejora en la Exposición de la Actividad sobre NovoSeven® FVIIa (Dependiente de TF) (calculado por Actividad/Dosis AUC* (Dependiente de TF)$_{\text{NovoSeven® FVIIa}}$/Actividad/Dosis AUC* (Dependiente de TF)$_{\text{FVIIa mutante}}$); Actividad/Dosis AUC* (Independiente de TF) (el plasma AUC/Dosis multiplicado por la Actividad Indirecta Independiente de TF (ver Tabla 15, de arriba); Mejora en la Exposición de la Actividad sobre NovoSeven® FVIIa (Independiente de TF) (calculado por Actividad/Dosis AUC* (Independiente de TF)$_{\text{NovoSeven® FVIIa}}$/Actividad/Dosis AUC* (Independiente de TF)$_{\text{FVIIa Mutante}}$).

448

000418

Tabla 24.

Mutación (numeración de FVII maduro)	% de Recupera-ción (in vivo)	Actividad/ Dosis AUC* (Dependiente de TF)	Mejora en la exposición de la actividad sobre Novo7 (Dependiente de TF)	Actividad/ Dosis AUC* (Indepen-diente de TF)	Mejora en la exposición de la actividad sobre Novo7 (Independiente de TF)
NovoSeven® FVIIa	60%	2.95E+10	1.0	7.26E+03	1.0
TN	46%	4.71E+10	1.4	1.22E+04	1.5
T239I/Q286R/M298Q/Q366N	52%	1.15E+11	3.9	1.38E+05	18.9
T239V/Q286R/M298Q/Q366N	66%	1.35E+11	4.6	4.69E+04	6.5
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F	66%	8.10E+10	2.8	9.77E+04	13.5
T239I/M298Q/H373F	60%	1.95E+10	0.7	7.77E+04	10.7
T239V/M298Q/H373F	17%	4.89E+09	0.2	3.53E+04	4.9
M298Q/H373F/Q366N	32%	1.19E+10	0.4	2.13E+04	2.9
V158D/Q286R/E296V	21%	2.97E+10	1.0	7.12E+04	9.8

000419

Mutación (numeración de FVII maduro)	% de Recupera-ción (in vivo)	Actividad/ Dosis AUC* (Dependiente de TF)	Mejora en la exposición de la actividad sobre Novo7 (Dependiente de TF)	Actividad/ Dosis AUC* (Indepen-diente de TF)	Mejora en la exposición de la actividad sobre Novo7 (Independiente de TF)
/M298Q/H373F					
A122N/G124S/A175S/ Q286R/M298Q/H373F	79%	2.64E+11	9.0	ND	ND
T128N/P129A/A175S/ Q286R/M298Q/H373F	85%	2.05E+11	7.0	ND	ND
A122N/G124S/A175S/ S222A /H257A/ Q286R/M298Q	76%	2.23E+11	7.6	ND	ND
T128N/P129A/A175S/ S222A/H257A/Q286R /M298Q	69%	2.16E+11	7.4	6.36E+04	8.8
A122N/G124S/ A175S/Q286R/M298Q	84%	2.73E+11	9.3	ND	ND
T128N/P129A/A175S/ Q286R/M298Q	76%	3.69E+11	12.6	ND	ND
Gla intercambio FIX /A122N/ G124S/ A175S/S222A/Q286R	42%	1.44E+11	4.9	ND	ND
Gla intercambio FIX /T128N/P129A/ A175S/S222A/Q286R	69%	1.08E+11	3.7	8.51E+04	11.7
H257A/Q286R /M298Q	42%	1.16E+11	4.0	6.33E+04	8.7
V258D/E296V/ M298Q/H373F	17%	1.36E+10	0.5	1.17E+05	16.1
Gla intercambio FIX /S222A/Q286R/H373F	42%	5.88E+10	2.0	3.90E+04	5.4
A122N/G124S/A175S/ Q286R	78%	1.68E+11	5.8	1.22E+04	1.7
T128N/P129A/A175S/ Q286R	34%	2.05E+11	7.0	2.01E+04	2.8
A122N/G124S/A175S/ S222A	60%	6.90E+10	2.4	ND	ND
T128N/P129A/A175S/ S222A	88%	7.31E+10	2.5	8.00E+03	1.1
A122N/G124S/A175S/ Q366V	60%	6.48E+10	2.2	6.42E+03	0.9
T128N/P129A/A175S/ Q366V	74%	7.43E+10	2.5	7.39E+03	1.0
Gla intercambio FIX/ S222A/Q286R/M298Q	40%	5.52E+10	1.9	1.09E+05	15.0
S222A/Q286R/M298Q	22%	4.46E+10	1.5	8.78E+04	12.1
Gla intercambio FIX/ S222A/Q286R/M298Q / H373F	16%	2.94E+10	1.0	1.99E+04	2.7
S222A/Q286R/M298Q /H373F	5%	1.57E+10	0.5	4.57E+04	6.3
H257S/Q286R/M298Q /H373F	20%	4.52E+10	1.5	9.01E+03	1.2

Mutación (numeración de FVII maduro)	% de Recuperación (in vivo)	Actividad/ Dosis AUC* (Dependiente de TF)	Mejora en la exposición de la actividad sobre Novo7 (Dependiente de TF)	Actividad/ Dosis AUC* (Independiente de TF)	Mejora en la exposición de la actividad sobre Novo7 (Independiente de TF)
S222A/H257S/Q286R/M298Q	72%	1.28E+11	4.4	3.39E+04	4.7
T239I/Q286R/M298Q/H373F	56%	8.73E+10	3.0	1.05E+04	1.5
T239V/Q286R	66%	1.35E+11	4.6	1.79E+04	2.5
V158D/T239V/E296V/M296Q	8%	4.08E+10	1.4	3.43E+05	47.3
T239I/Q286R/H373F	77%	1.14E+11	3.9	ND	ND
S222A/T239I/H257A/Q286R/M298Q	61%	1.38E+11	4.7	6.26E+04	8.6
T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q	81%	1.72E+11	5.9	1.64E+05	22.6
Gla intercambio FIX/T239I/Q286R/M298Q	56%	1.59E+11	5.4	3.10E+05	42.6
T239I/Q286R/M298Q	54%	1.16E+11	4.0	1.16E+04	1.6
Gla intercambio FIX /S222A/T239I/Q286R	42%	7.27E+10	2.5	2.18E+04	3.0
S222A/T239I	71%	3.97E+10	1.4	2.19E+03	0.3
T239I/Q286R	56%	1.05E+11	3.6	8.34E+03	1.1
V158D/T239I/E296V/M298Q	34%	5.38E+10	1.8	8.01E+04	11.0
T239V/Q286R/M298Q/H373F	10%	2.54E+10	0.9	6.07E+03	0.8
T239V/Q286R/H373F	16%	4.09E+10	1.4	4.69E+03	0.6
T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	49%	6.84E+10	2.3	1.01E+05	13.9
S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	15%	3.87E+10	1.3	2.59E+04	3.6
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q	60%	9.47E+10	3.2	2.10E+05	28.9
(Gla intercambio FIX/T239V/Q286R/M298Q	34%	9.24E+10	3.2	1.01E+05	14.0
T239V/Q286R/M298Q	21%	6.85E+10	2.3	1.17E+04	1.6
Gla intercambio FIX/S222A/T239V/Q286R	33%	9.32E+10	3.2	7.99E+03	1.1
S222A/T239V	10%	9.52E+09	0.3	3.83E+02	0.1
V158D/Q286R/E296V/M298Q	15%	2.56E+10	0.9	1.76E+05	24.3
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F	36%	7.92E+10	2.7	1.83E+04	2.5
Q286R/M298Q/H373F	66%	1.39E+11	3.9	1.42E+05	12.1
T128N/P129A/Q286R/H373F	49%	2.03E+11	6.9	1.93E+04	2.7
(Gla intercambio FIX K[43]I)/ T128N/	45%	9.88E+10	3.4	8.58E+04	11.8

Mutación (numeración de FVII maduro)	% de Recupera-ción (in vivo)	Actividad/ Dosis AUC* (Dependiente de TF)	Mejora en la exposición de la actividad sobre Novo7 (Dependiente de TF)	Actividad/ Dosis AUC* (Indepen-diente de TF)	Mejora en la exposición de la actividad sobre Novo7 (Independiente de TF)
P129A Q286R/M298Q /Q366N					
{Gla intercambio FIX K[43]I}/Q286R/ M298Q/Q366N	36%	4.35E+10	1.5	2.18E+04	3.0
Q286R/M298Q/ Q366N	41%	1.33E+11	4.5	7.50E+04	10.3
M298Q/K341D	84%	4.26E+10	1.0	1.02E+04	0.6
Q286R/M298Q/ K341D	33%	4.98E+09	0.1	5.24E+03	0.3
A175S/Q286R/Q366V	22%	3.72E+10	0.9	7.31E+03	0.4
S52A/S60A/S222A/H 257A/Q28R/M2986Q	45%	1.17E+11	4.0	5.42E+04	7.5
T128N/P129A/S222A/ H257A/Q286R/ M2986Q	53%	1.80E+11	6.1	5.23E+04	7.2
S222A/H257A/Q286R /M298Q	9%	3.04E+10	0.9	4.17E+04	4.9
S222A/M298Q	7%	8.63E+09	0.2	9.51E+04	5.1
{Gla intercambio FIX/K[43]I}/T128N/ P129A/Q286R/M298Q	23%	2.46E+08	0.0	6.00E+04	8.3
Gla intercambio FIX/S52A/S60A/ Q286R/M298Q	32%	4.63E+10	1.6	2.54E+05	34.9
S52A/S60A/ Q286R/M298Q	31%	4.67E+10	1.6	8.11E+04	11.2
{Gla intercambio FIX/M[19]K}/ Q286R/M298Q	69%	9.11E+10	3.1	3.32E+05	45.7
{Gla intercambio FIX/Q[44]S}/ Q286R/M298Q	35%	5.77E+10	2.0	2.12E+05	29.2
{Gla intercambio FIX/K[43]I}/ Q286R/M298Q	28%	1.20E+11	4.1	3.96E+05	54.5
{Gla intercambio FIX/E[40]L}/ Q286R/M298Q	36%	8.04E+10	2.7	3.14E+05	43.3
Gla intercambio FIX /T128N/P129A/ Q286R/M298Q	84%	9.00E+10	3.1	3.58E+04	4.9
T[128]N/P[129]A/ Q286R/M298Q	66%	1.55E+11	5.3	2.20E+05	30.3
T[128]N/P[129]A/ Q286R/M298Q	62%	4.21E+11	14.4	1.84E+05	25.4
Q143R/M156Q/Gla intercambio FIX	21%	8.53E+10	2.7	2.30E+05	29.9
Q286R/M298Q	51%	1.08E+11	3.2	1.03E+05	11.2

Mutación (numeración de FVII maduro)	% de Recuperación (in vivo)	Actividad/ Dosis AUC* (Dependiente de TF)	Mejora en la exposición de la actividad sobre Novo7 (Dependiente de TF)	Actividad/ Dosis AUC* (Independiente de TF)	Mejora en la exposición de la actividad sobre Novo7 (Independiente de TF)
S222A/H257A/Q286R	40%	1.55E+11	4.4	2.72E+04	3.2
Gla intercambio FIX/T128N/P129A /S222A/Q286R	44%	1.37E+11	4.7	1.44E+04	2.0
Gla intercambio FIX/S222A Q286R	32%	5.95E+10	1.4	2.15E+04	1.2
S222A/Q286R	51%	1.85E+11	5.4	4.61E+04	2.5
H257A/Q286R	63%	3.66E+11	12.5	1.59E+04	2.2
A122N/G124S/A175S	82%	8.70E+10	2.4	2.18E+04	1.2
T128N/P129A/A175S	80%	6.16E+10	1.7	ND	ND
S119N/L121S/A175S	60%	8.68E+10	2.5	ND	ND
K109N/A175S	22%	4.73E+10	1.3	ND	ND
A175S	52%	8.10E+10	2.4	1.40E+04	0.8
G318N	37%	5.22E+10	1.2	0.00E+00	0.0
A122N/G124S/E394N /P395A/R396S	46%	1.07E+11	2.5	ND	ND
Gla intercambio FIX/Q366V	26%	1.43E+10	0.5	1.41E+04	1.9
Q366V	3%	4.09E+09	0.1	1.44E+03	0.1
H257S	39%	1.67E+11	5.1	1.30E+04	0.9
H257A	36%	4.96E+10	1.2	1.18E+04	0.6
S52A/S60A/S222A	11%	1.05E+10	0.4	5.28E+03	0.7
T128N/P129A/S222A	21%	5.28E+10	1.8	4.06E+03	0.6
S222A	10%	1.55E+10	0.4	8.56E+03	0.5
K341D	98%	4.77E+10	1.1	ND	ND
S52A/S60A/Q286R	67%	6.42E+10	2.2	1.59E+04	2.2
T128N/P129A/Q286R	67%	4.13E+11	14.1	4.24E+04	5.8
Q286R	35%	1.31E+11	3.7	3.52E+04	2.6
S52A/S60A/V158D/E 296V/M298Q	7%	9.34E+09	0.3	8.24E+04	11.3
T128N/P129A/V158D /E296V/M298Q	21%	5.03E+10	1.7	3.44E+05	47.4
T128N/P129A/M298Q	58%	3.11E+10	1.1	4.49E+04	6.2
M286Q	18%	1.33E+10	0.4	4.93E+04	3.8
S52A/S60A	51%	5.36E+10	1.4	7.76E+03	0.6
A51N	15%	4.65E+10	1.1	9.39E+03	0.5
A122N/G124S	45%	5.26E+10	1.8	4.61E+03	0.6
A122N/G124S	45%	9.20E+10	2.2	0.00E+00	0.0
K109N	52%	1.05E+11	3.6	ND	ND
K109N	52%	8.43E+10	2.0	ND	ND
S52A	37%	3.50E+10	0.8	0.00E+00	0.0
Gla intercambio FIX	31%	2.63E+10	0.7	1.28E+04	1.4
T128N/P129A	88%	8.25E+10	2.4	25147.5	2.6
P257insGGGSCSFGR GDIRNVC	38%	6.29E+10	1.5	ND	ND

Ejemplo 10 Determinación del Factor VIIa enlazado a Factor de Tejido Soluble

La capacidad de las variantes FVIIa expresadas de células

453

HEK 293 o BHK para enlazar el factor de tejido soluble (sTF) se evaluó usando resonancia de plasmón de superficie Biacore. Las variantes FVIIa se evalúan a través de la medición del perfil de enlace en tres concentraciones de proteasa en dos experimentos en duplicado, usando dos niveles diferentes de sTF enlazado a un chip Biacore CM5.

Un nuevo chip de sensor CM5 de Serie S (GE Healthcare Cat #BR 1006-68) se acopló con albúmina de suero de bovino y factor de tejido soluble usando un instrumento Biacore T100. El acoplamiento se llevo a cabo usando una Solución amortiguadora de Acoplamiento Biacore (Na 30 mM Hepes pH 7.4, NaCl135 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0.01%) con un kit de acoplamiento de Amina (GE Healthcare Cat # BR-1000-50) y el protocolo asistente en el software Biacore T100. Para la inmovilización, las cuatro células del chip se usaron. Las células 1 y 3 se acoplaron con 500 unidades de respuesta (RU) de proteína de referencia de albúmina de suero de bovino diluida en solución amortiguadora de acetato, pH 4.0 y las células 2 y 4 se acoplaron con 500 y 250 RU de sTF (R&D Systems) diluidas en solución amortiguadora de acetato, pH 4.5.

Cada variante FVIIa, y la proteasa FVIIa de tipo silvestre, se probó en tres concentraciones y en duplicado. Las proteasas se diluyeron hasta 60 nM, 30 nM y 15 nM en 100 µL de solución amortiguadora de ensayo Biacore (Na 20 mM Hepes, pH 7.4, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 5 mM, PEG 8000 al 0.1%, BSA al 0.1%, Tween-20 al 0.01%) en una placa de ensayo de 96 pozos. Cada muestra se procesó por ensayo en el instrumento Biacore T100 usando 120 segundos de tiempo de contacto seguido por 180 segundos de

tiempo de disociación en una velocidad de flujo 10 µL/min. Un blanco de solución amortiguadora también se procesó por ensayo. El chip se regeneró con EDTA 50 mM, pH 7.0 durante 60 segundos luego 30 segundos. El ensayo para medir el enlace de FVIIa de tipo silvestre a sTF deberá proporcionar tres conjuntos de curvas que dan un Ka de aproximadamente 8 nM.

El software de Evaluación Biacore T100 se usó para analizar los datos. Específicamente, el análisis de enlace de cinéticos/afinidad 1:1, que ajusta los datos para el isoterma Langmuir, se utilizó y los datos se fijaron individualmente durante dos replicados de cada variante en dos acoplamientos de unidad de respuesta. Los cuatro valores K_d ajustados se promediaron y se presentan en la Tabla 25. Las variantes FVIIa que contienen la mutación M298Q tienen a mostrar resultados K_d inferiores y de esta manera enlazar más herméticamente a sTF.

Tabla 25. Enlace de variantes FVIIa a TF soluble

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Afinidad K_d (nM)	
		células 293-F	células BHL
Tipo natural	Tipo natural	7.9	9.0
Q286N	Q143N	8.9	
Q286E	Q143E	3.8	
Q286D	Q143D	9.8	
Q286S	Q143S	8.2	
Q286T	Q143T	10.6	
Q286R	Q143R	7.6	
Q286K	Q143K	8.2	
Q286A	Q143A	6.3	
Q286V	Q143V	11.9	
S222A	S82A	4.2	
H257S	H117S	4.2	
Q366D	Q217D	3.2	
Q366E	Q217E	5.6	
Q366N	Q217N	3.8	
Q366T	Q217T	7.1	
Q366S	Q217S	9.0	
Q366V	Q217V	7.9	
A175S	A39S	6.5	
V158T/L287T/M298K	V21T/L144T/M156K	8.4	
V158D/L287T/M298K	V21D/L144T/M156K	8.5	
Q286R/S222A	Q143R/S82A		7.3
Q286R/S222A/Gla intercambio FIX	Q143R/S82A/Gla intercambio FIX	8.4	
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q		4.7
Q286R/M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q		11.4
Q286R/M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE		4.9
S222A/M298Q	S82A/M156Q		5.1
H257A/M298Q	H117A/M156Q		3.1
S222A/H257A /Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	2.5	
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V	29.3	
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V		18.3
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V		8.6
Q286M	Q143M	7.1	
Q286L	Q143L	7.1	

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Afinidad K_d (nM)	
		células 293-F	células BHL
Q286Y	Q143Y	7.5	
Q366I	Q217I	6.7	
Q366L	Q217L	5.2	
Q366M	Q217M	4.7	
H216A/H257A	H76A/H117A	6.0	
Q286R/K341D	Q143R/K192D	3.5	
M298Q/K341D	Q143R/Q217D	7.9	
Q286R/Q366N	Q143R/Q217N	8.0	
Q286R/M298Q/Q366D	Q143R/M156Q/Q217D	4.6	
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	3.8	

Un conjunto adicional de experimentos se realizó para evaluar el enlace de variantes FVIIa a TF soluble usando el mismo ensayo como se describe arriba, pero con una modificación de la dosis FVIIa en el intervalo hasta 30 nM, 15 nM y 7.5 nM y el análisis de datos de manera que un modelo de dos estados se usó para fijar los datos SPR. Este análisis del modelo de dos estados se proporcionó en el software de Evaluación Biacore T100 privado y reproducido a continuación. Los resultados se proporcionan en la Tabla 26, a continuación.

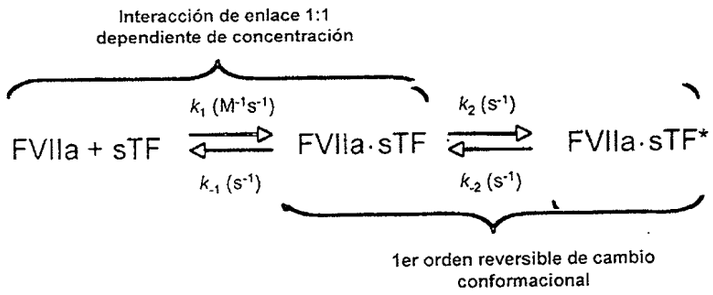

Tabla 26. Enlace de variantes FVIIa para TF soluble

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Afinidad K_d (nM)	SD	%CV	Afinidad $K_{d\text{-}TN}/K_{d\text{-}mut}$	n
TN (NovoSeven®)	TN (NovoSeven®)	6.5	1.2	19%	1.2	19
TN (NovoSeven-RT®)	TN (NovoSeven-RT®)	6.3	85%	13%	1.2	4
TN	TN	7.6	1.9	24%	1.0	6
TN †	TN †	3.9	0.6	15%	1.0	6
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	6.8	1.2	18%	1.1	7
Gla intercambio FIX	Gla intercambio FIX	36.0	2.6	7%	0.2	3
K109N	K[109]N	10.8	0.2	2%	0.7	2
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A	23.2	4.0	17%	0.3	2
M298Q	M156Q	5.9	0.7	11%	1.3	4
M298Q †	M156Q †	1.9	0.1	7%	2.0	2
T128N/P129A/M298Q †	T[128]N/P[129]A/M156Q †	2.4	0.4	16%	1.6	2
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	2.0	0.5	26%	3.9	10
V158D/E296V/M298Q †	V21D/E154V/M156Q †	1.8	0.5	30%	2.2	4
T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q	T[128]N/P[129]A/V21D/E154V/M156Q	2.0	0.1	4%	3.9	2
S52A/S60A/V158D/E296V/M1298Q	S[52]A/S[60]A/V21D/E154V/M156Q	14.6	1.3	9%	0.5	2
Q286R	Q143R	6.7	0.4	5%	1.1	2
T128N/P129A/Q286R	T[128]N/P[129]A/Q143R	11.1	4.3	39%	0.7	6
T128N/P129A/Q286R †	T[128]N/P[129]A/Q143R †	10.0	1.6	16%	0.4	4
S52A/S60A/Q286R	S[52]A/S[60]A/Q143R †	51.6	18.4	36%	0.1	5
S222A	S82A	2.6	0.1	4%	3.0	2
T128N/P129A/S222A	T[128]N/P[129]A/S82A	3.6	0.2	7%	2.1	2
S52A/S60A/S222A	S[52]A/S[60]A/S82A	17.2	2.4	14%	0.4	2
H257S	H117S	6.6	1.5	23%	1.2	2
Gla intercambio FIX/O366V	Gla intercambio FIX/Q217V	56.0	15.1	27%	0.1	3
A175S	A39S	12.3	0.1	1%	0.6	2
K109N/A175S	K[109]N/A39S	9.0	0.0	0%	0.8	2
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	6.6	0.1	1%	1.1	2
T128N/P129A/A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	10.0	0.1	1%	0.8	2
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	12.1	2.2	18%	0.6	2
Q286R/H257A	Q143R/H117A	7.2	1.0	13%	1.1	2
Q286R/H257A †	Q143R/H117A †	5.5	0.1	2%	0.7	2
Q286R/S222A	Q143R/S82A	3.4	0.2	6%	2.3	2
Gla intercambio FIX/ T128N/P129A/ S222A/Q286R	Gla intercambio FIX/ T[128]N/P[129]A/ S82A/Q143R	21.3	5.6	26%	0.4	6
Gla intercambio FIX/ T128N/P129A/	Gla intercambio FIX/ T[128]N/P[129]A/	24.6	6.4	26%	0.2	6

458

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Afinidad K_d (nM)	SD	%CV	Afinidad $K_{d\text{-}TN}/K_{d\text{-}mut}$	n
S222A/Q286R †	S82A/Q143R †					
Gla intercambio FIX/ S52A/S60A/S222A/Q286R	Gla intercambio FIX/ S[52]A/S[60]A/S82A/Q143R	56.9	8.5	15%	0.1	2
Q286R/S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	6.0	0.5	8%	1.3	2
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	4.1	0.5	11%	1.9	9
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q †	3.6	1.1	29%	1.1	13
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q §	3.2	0.2	7%	1.2	4
Gla intercambio FIX/ Q286R/M298Q	Gla intercambio FIX/ Q143R/M156Q	30.4	5.4	18%	0.3	3
Gla intercambio FIX/ Q286R/M298Q †	Gla intercambio FIX/ Q143R/M156Q †	22.1	1.5	7%	0.2	8
T128N/P129A/Q286R/ M298Q	T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q	4.7	1.2	26%	1.6	5
T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q †	3.9	0.4	11%	1.0	8
Gla intercambio FIX /T128N/P129A/Q286R/ M298Q	Gla intercambio FIX /T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q	20.8	1.4	7%	0.4	5
Gla intercambio FIX /T128N/P129A/Q286R/ M298Q †	Gla intercambio FIX /T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q †	37.5	12.3	33%	0.1	8
{Gla intercambio FIX/E40L}/ Q286R/M298Q	{Gla intercambio FIX/E[40]L}/ Q143R/M156Q	38.5	7.4	19%	0.2	2
{Gla intercambio FIX/K43I}/ Q286R/M298Q	{Gla intercambio FIX/K[43]I}/ Q143R/M156Q	35.3	3.4	10%	0.2	2
{Gla intercambio FIX/K43I}/ Q286R/M298Q †	{Gla intercambio FIX/K[43]I}/ Q143R/M156Q †	23.7	3.6	15%	0.2	2
{Gla intercambio FIX/Q44S}/ Q286R/M298Q	{Gla intercambio FIX/Q[44]S}/ Q143R/M156Q	40.8	6.4	16%	0.2	3
{Gla intercambio FIX/M19K}/ Q286R/M298Q	{Gla intercambio FIX/M[19]K}/ Q143R/M156Q	16.7	2.4	14%	0.5	2
S52A/S60A/ Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q	25.1	1.7	7%	0.3	3
Gla intercambio FIX /S52A/S60A/Q286R/M298Q †	Gla intercambio FIX/ S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q †	6.0	0.1	1%	0.6	2
{Gla intercambio FIX/ M19K/E40L/K43I/Q44S}	{Gla intercambio FIX/ M[19]K/E[40]L/K[43]I/Q[44]	4.9	0.1	1%	1.6	2

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Afinidad K_d (nM)	SD	%CV	Afinidad $K_{d\text{-TN}}$/ $K_{d\text{-mut}}$	n
/Q286R/M298Q	S} /Q143R/M156Q					
{Gla intercambio FIX/K43I} /T128N/P129A/ Q286R/M298Q †	{Gla intercambio FIX/K[43]I} /T[128]N/P[129]A/Q143R/M 156Q †	10.5	1.3	13%	0.4	2
T239V	T99V	5.2			1.5	1
T239I	T99I	6.2			1.2	1
T128N/P129A/S222A/ H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/H11 7A/Q143R/M156Q	2.6	0.3	11%	3.0	2
T128N/P129A/S222A/ H257A/Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/S82A/H11 7A/Q143R/M156Q †	4.0	0.2	4%	1.0	2
S52A/S60A/S222A/H257A/Q 286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H117A /Q143R/M156Q	11.1	2.7	24%	0.7	2
T128N/P129A/Q286R/M298 Q/Q366N †	T[129]N/P[129]A/Q143R/M1 56Q/Q217N †	3.2	0.6	18%	1.2	2
{Gla intercambio FIX/K43I}/Q286R/M298Q/Q 366N †	{Gla intercambio FIX/K[43]I} /Q143R/M156Q/Q217N †	13.0	0.7	5%	0.3	2
{Gla intercambio FIX/K43I}/T[128]N/P[129]A /Q286R/M298Q/Q366N †	{Gla intercambio FIX/K[43]I} /T[128]N/P[129]A/Q143R/M 156Q/Q217N †	13.1	0.3	2%	0.3	2
T128N/P129A/Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/H2 24F	6.8	0.0	0%	1.1	2
T128N/P129A/Q286R/M298 Q/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M1 56Q/H224F	3.1	0.1	4%	2.4	2
S52A/S60A/Q286R/M298Q/ H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156 Q/H224F	23.4	7.5	32%	0.3	3
T128N/P129A/M298Q/H373 F †	T[128]N/P[129]A/M156Q/H2 24F †	1.3	0.5	41%	3.1	2
V21D/Q143R/E154V/M156Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	2.2	0.2	8%	3.5	2
Gla intercambio FIX /S222A/T239V/Q286R	Gla intercambio FIX /S82A/T99V/Q143R	19.1	7.7	40%	0.4	7
Gla intercambio FIX /S222A/T239V/Q286R †	Gla intercambio FIX /S82A/T99V/Q143R †	14.9	0.4	3%	0.3	2
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	2.5	0.1	4%	3.1	2
Gla intercambio FIX/ T239V/Q286R/M298Q	Gla intercambio FIX/ T99V/Q143R/M156Q	22.7	6.8	30%	0.3	6
Gla intercambio FIX	Gla intercambio FIX/	25.7	9.2	36%	0.2	6

460

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Afinidad K_d (nM)	SD	%CV	Afinidad $K_{d\text{-}TN}$/ $K_{d\text{-}mat}$	n
T239V/Q286R/M298Q †	T99V/Q143R/M156Q †					
T128N/P129A/T239V/Q286R /M298Q †	T[128]N/P[129]A/ T99V/Q143R/M156Q †	7.8	0.6	8%	0.5	2
S222A/T239V/H257A/ Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R/ M156Q	2.2	0.0	2%	3.4	2
T128N/P129A/S222A/T239V /H257A/Q286R/M298Q †	[T128]N/P[129A]/S82A/T99 V/H117A/Q143R/M156Q †	3.6	0.7	18%	1.1	2
T128N/P129A/T239V/Q286R /M298Q/H373F †	T[128N]/P129]A/T99V/Q143 R/M156Q/H224F †	3.9	0.1	3%	1.0	2
T239I/Q286R	T99I/Q143R	8.0	0.2	3%	1.0	2
Gla intercambio FIX/S222A/T239I/Q 286R	Gla intercambio FIX /S82A/T99I/Q143R	39.6	1.2	3%	0.2	2
Gla intercambio FIX/ T239I/Q286R/M298Q	Gla intercambio FIX /T99I/Q143R/M156Q	13.1	2.1	16%	0.6	2
T128N/P129A/T239I/Q286R/ M298Q †	[T128]N/P[129A]/ T99I/Q143R/M156Q †	5.1	0.9	18%	0.8	2
T239I/Q286R/H373F	T99I/Q143R/H224F	7.8	0.1	1%	1.0	2
V158D/T239V/E296V/M298 Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	1.7	0.6	32%	4.4	4
V158D/T239V/E296V/M298 Q †	V21D/T99V/E154V/M156Q †	1.9	0.7	36%	2.1	4
T239V/Q286R	T99V/Q143R	2.3	0.0	1%	1.7	2
T128N/P129A/T239I/ Q286R/M298Q/ H237F †	T[128]N/P[129]A/T99I/ Q143R/M156Q/H224F †	3.4	0.0	0%	1.2	2
Gla intercambio FIX/ Q286R/S222A/H257S	Gla intercambio FIX/ Q143R/S82A/H117S	34.3	9.1	27%	0.2	3
S222A/Q286R/M298Q/ H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	2.1	0.1	6%	3.7	2
Gla intercambio FIX/S222A/ Q286R/M298Q/H373F	Gla intercambio FIX S82A/Q143R/M156Q/H224F	9.5	0.9	9%	0.8	2
T128N/P129A/A175S/ Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/Q21 7V	6.5	12.0	184%	1.2	2
A122N/G124S/A175S/ Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/Q21 7V	13.0	0.6	5%	0.6	2
T128N/P129A/A175S/ S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/S82 A	4.5	0.3	7%	1.7	2
A122N/G124S/A175S/ S222A	A[122]N/G[124]S/A39S/S82 A	7.0	0.6	9%	1.1	2

461

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Afinidad K_d (nM)	SD	%CV	Afinidad $K_{d\text{-}TN}/K_{d\text{-}mut}$	n
T128N/P129A/A175S/Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R	8.6	0.1	1%	0.9	2
A122N/G124S/A175S/Q286R	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R	8.6	0.0	0%	0.9	2
Gla intercambio FIX/S222A/Q286R/H373F	Gla intercambio FIX/S82A/Q143R/H224F	40.9	7.5	18%	0.2	3
Gla intercambio FIX/A122N/G124S/A175S/S222A/Q286R	Gla intercambio FIX/A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/Q143R	43.7	14.0	32%	0.2	2
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156Q	5.5	0.0	0%	1.4	2
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q	5.3	0.1	2%	1.4	2
T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	6.7	0.8	11%	1.1	2
A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	7.7	0.6	8%	1.0	2
T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156Q/H224F	7.4	3.2	43%	1.0	2
A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q/H224F	5.0	0.1	3%	1.5	2
V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F	V21D/Q143R/E154V/M156Q/H224F	1.7	0.5	27%	4.5	3
M298Q/Q366N/H373F †	M156Q/Q217N/H224F †	1.6	0.9	60%	2.5	4
T239V/M298Q/H373F †	T99V/M156Q/H224F †	3.5	0.4	11%	1.1	2
T239I/M298Q/H373F †	T99I/M156Q/H224F	2.3	0.6	24%	1.7	4
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F †	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/Q217N/H224F †	2.6	0.6	23%	1.5	2
T239V/Q286R/M298Q/Q366N †	T99V/Q143R/M156Q/Q217N †	4.1	0.3	8%	0.9	2
T239I/Q286R/M298Q/Q366N †	T99I/Q143R/M156Q/Q217N †	2.4	0.6	27%	1.6	2

† producido en células CHOX

§ producido en línea celular estable CHOX clon 52-5F7

Ejemplo 11

Inhibición de variantes FVIIa por Zn^{2+}

Las variantes FVIIa, expresadas de células HEK 293 o BHK, se

462

procesaron por ensayo para resistencia de la inhibición por Zn^{2+} tanto en la presencia o ausencia de factor de tejido soluble. Brevemente, $ZnCl_2$ (Aldrich) se diluyó hasta 20 mM en dH_20 luego hasta 4 mM en 1 x solución amortiguadora de ensayo (Na 50 mM Hepes, pH 7.5, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 1.5 mM, Tween-20 al 0.01% y PEG-8000 0.01%). Se hicieron diluciones 2 veces en serie para generar once concentraciones de zinc, bajando hasta 3.9µM, a través de una placa de 96 pozos. El último pozo en la fila contiene solución amortiguadora sin zinc para medir la actividad proteolítica FVIIa no inhibida. Las variantes FVIIa, y la proteasa de tipo silvestre, se diluyó hasta 500 nM luego de nuevo 10 veces hasta 50 nM. Esta solución madre 50 nM se usó para ensayos realizados sin el factor de tejido soluble (sTF, R&D Systems). Para ensayos con el factor de tejido soluble, la proteasa se diluyó de nuevo en 1X solución amortiguadora de ensayo con sTF hasta concentraciones finales de 12.5 nM y 125 nM, respectivamente. Las soluciones se preincubaron durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente.

Para iniciar la reacción de inhibición, 20 µL de la solución FVIIa/sTF o FVIIa se mezcló con 60 µL de la serie de zinc a cada fila para diez concentraciones. Para las reacciones de inhibición con solo FVIIa, las mezclas se iniciaron usando $ZnCl_2$ 2 mM, y para FVIIa/sTF, se iniciaron usando $ZnCl_2$ 4 mM. La placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para ensayo la inhibición Zn^{2+}, 20 µL de sustrato FVIIa (Mesyl-dFPR-ACC, disuelto hasta 20 mM en DMSO y diluido en solución amortiguadora de ensayo) se agregó a los pozos a una concentración final de 90 µM. Las concentraciones de sTF y zinc se mantuvieron en el ensayo

467

al agregarlas como sea apropiado a la solución de sustrato. El incremento de fluorescencia (Ex: 380 nm, Em: 460 nm) se midió durante 60 minutos a 30°C en un lector de placa Spectramax Gemini M5 (Molecular Devices). La actividad proteolítica de residuo se calculó en cada concentración de zinc al dividir la velocidad inhibida por la velocidad de proteasa no inhibida. La concentración Zn^{2+} necesaria para inhibir la mitad de la actividad proteolítica ($K_{0.5}$) se calculó al graficar la concentración de zinc contra la actividad de residuo, y ajustó con una ecuación hiperbólica usando software XLFit4 (IDBS). Cada proteasa se procesó por ensayo dos veces en dos ocasiones separadas para obtener un valor promedio para el $K_{0.5}$.

Los resultados se proporcionan en la Tabla 27. Las mutaciones H257 y H216 incrementan la resistencia por aproximadamente 3 veces. Las mutaciones M268Q también incrementan la resistencia a zinc por 3 veces. En todos los casos, el efecto se mantuvo para diferir los grados cuando se combinan con mutaciones adicionales. Las variantes más resistentes fueron combinaciones de las mutaciones de arriba: H216A/H257A-FVIIa y H257A/M298Q-FVIIa.

Tabla 27. Inhibición de variantes FVIIa por Zn^{2+}

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (mM)	
		HEK 293	BHK
TN	TN	87.0	42.0
M298Q	M156Q	187.3	
Q286R	Q143R	30.1	22.5
H216S	H76S	231.0	
H216A	H76A	244.5	
H216K	H76K	248.8	
H216R	H76R	316.5	
S222A	S82A	87.5	63.8
S222K	S82K	73.0	
H257A	H117A	217.5	113.0
H257S	H117S	149.7	128.0
K161S	K24S	51.5	
K161A	K24A	73.5	
K161V	K24V	79.5	
Q286R/S222A	S82A/Q143R		24.5
Q286R/S222A/Gla intercambio FIX	S82A/Q143R/gla intercambio FIX	34.0	
S222A/M298Q	S82A/M156Q	138.0	
H257A/M298Q	H117A/M156Q	481.0	
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	180.6	
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V	40.5	
S222V	S82V	86.8	
S222D	S82D	89.5	
S222N	S82N	94.6	
S222E	S82E	110.5	
H216A/H257A	H76A/H117A	407.5	
H216A/S222A	H76A/S82A	226.0	
H257S/Q286R	H117S/Q143R	316.5	
S222A/H373A	S82A/H224A	94.0	

Ejemplo 12

Determinación de la concentración de Proteasa Catalíticamente Activa usando la Titulación del Sitio Activo de *p'*-guanidinobenzoato de 4-metilumbeliferilo (MUGB)

En algunos casos, la concentración de FVIIa catalíticamente activo en una solución madre se determinó al titular un FVIIa complejo y factor de tejido soluble (sTF) con *p'*-guanidinobenzoato de 4-metilumbeliferilo (MUGB), un sustrato

465

de éster fluorogénico desarrollado como un sitio activo para serina proteasas tipo tripsina. El ensayo se llevo a cabo esencialmente como se describe por Payne et al. (Biochemistry (1996) 35:7100-7106) con unas pocas modificaciones menores. MUGB fácilmente reacciona con FVIIa, pero no FVII o proteasa inactiva, para formar un intermediario de enzima acilo efectivamente estable bajo condiciones en las cuales la concentración de MUGB está saturada y la desacilación es especialmente lenta y limita la velocidad para la catálisis. Bajo estas condiciones, la proteasa FVIIa experimenta una vuelta catalítica sencilla para liberar el fluoróforo de 4-metilumbeliferona (4-MU). Cuando el estallido inicial de fluorescencia se calibra a una curva estándar de concentración externa de fluorescencia 4-MU, la concentración de sitios activos puede calcularse.

Los ensayos se realizaron con un volumen de reacción de 1 mL o 2 mL en unas cubetas de cuarzo de 0.4 cm x 1 cm o 1 cm x 1 cm, respectivamente, bajo agitación continua. Cada reacción contiene sTF 0.5 µM (R&D Systems Human) en una solución amortiguadora de ensayo que contiene Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 5 mM y PEG 8000 al 0.1%, pH 7.6. La solución estándar 4-MU se preparó frescamente en una concentración madre de 0.5 M en DMSO y la concentración se confirma por espectroscopia de absorbancia en 360 nm usando un coeficiente de extinción de 19,000 M^{-1} cm^{-1} en solución amortiguadora de Tris 50 mM, pH 9.0. El MUGB se preparó en una concentración madre de 0.04 M en DMSO con base en el peso seco. Los ensayos se iniciaron al agregar 4 µL de MUGB 4 mM (para la reacción de 2.0 mL) o MUGB 2 mM (para

466

la reacción de 1.0 mL) (en cada caso una concentración final 8 µM) para una solución de sTF 0.5 µM (20.2 µL o 10.1 µL de sTF 49.4 µM) en 1× solución amortiguadora de ensayo y primero medir la hidrólisis de respaldo de MUGB para ~150-200 segundos antes de la adición de FVIIa o variante FVIIa a una concentración final de ~100-200 nM con base en el ELISA inicial (Ejemplo IC.1) o la titulación de sitio activo con FFR-CMK (Ejemplo 3). La liberación de fluorescencia 4-MU en la fase de estallido de la reacción fue seguido por unos 1000-1200 segundos adicionales. Una curva estándar de 4-MU libre se preparó por titulación de la 4-MU calibrada de absorbancia en 1× solución amortiguadora de ensayo que contiene sTF 0.5 µM en etapas 20 nM para una concentración final de 260-300 nM.

Para el análisis de datos, los rastros de la reacción se importaron en el paquete de software Graphpad Prism y la contribución de hidrólisis de respaldo se sustrajo de la curva por extrapolación de la velocidad medida inicial de hidrólisis MUGB espontanea, que típicamente fue menor que 5% del estallido de fluorescencia total. La curva corregida se fijó a una ecuación exponencial sencilla con un componente lineal (conteo para la velocidad lenta de desacilación) de la forma $\Delta Fluorescencia = Amp(1-e^{-kt})+Bt$, donde Amp = la amplitud de la fase de estallido bajo las condiciones de ensayo saturadas resumidas arriba, k es la constante de velocidad de primer orden observada para la formación de la enzima acilo y B es una constante de velocidad de volumen asociada con vuelta completa de MUGB. La concentración de proteasa FVIIa activa se calcula por comparación del parámetro fijo para la amplitud para la

curva estándar 4-MU. Los valores de ensayos múltiples se midieron, promediaron y la desviación estándar se determina.

Ejemplo 13

Actividad específica de polipéptidos variantes FVIIa para Mesil-dFPR-ACC

Para evaluar la actividad de variantes FVIIa, se determinó la actividad (actividad/mol) de polipéptidos FVIIa para escisión de un sustrato ACC de tripéptido (Mesil-dFPR-ACC) bajo un conjunto de condiciones de ensayo estandarizado. En ensayo involucra una preincubación de polipéptidos FVIIa con una cantidad saturada de sTF antes de la dilución en el sustrato mesil-dFPR-ACC. Las velocidades iniciales de la escisión del sustrato luego se siguieron al evaluar el incremento en fluorescencia ACC. Las velocidades iniciales de liberación de fluorescencia se normalizaron para una curva estándar ACC interna y los datos se reportaron como µmol/seg/µmol FVIIa.

Para preparar las reacciones, cada muestra FVIIa a probarse se diluyó en una placa de almacenamiento de polipropileno hasta 200 nM en 1 x solución amortiguadora de ensayo (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 5 mM, BSA al 0.1%, PEG-8000 al 0.1%, pH 7.5). Donde sea necesario, una dilución 1:10 de la solución madre FVIIa se preparó de manera que el volumen pipetado mínimo fue 5 µL. Una dilución de factor de tejido soluble madre (sTF) (R&D Systems) se preparó para una concentración final de 1.0 µM con un volumen apropiado de 1X solución amortiguadora de ensayo necesario para conteo para la

separación por exclusión de 8 hasta 32 proteasas/placa. Por ejemplo, cuando se procesa por ensayo 8 proteasas, 1.0 mL de 1.0 µM sTF se requirió/placa, mientras que para procesar el ensayo 32 proteasas, 2.5 mL de sTF se requirió/placa. Las muestras FVIIa se hicieron en complejo con sTF a una concentración final de FVIIa 100 nM/sTF 500 nM en un volumen de ensayo 50 µL al mezclar 25 µL de variante FVIIa 200 nM con 25 µL de 1.0 µM sTF en la placa de almacenamiento de polipropileno. Las reacción de complejo FVIIa/sTF luego se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos para buscar el equilibrio. Después del periodo de equilibrio, 10 µL de cada reacción de complejo FVIIa/sTF se dispensó en la fila correspondiente de una placa de ensayo negra de área media de 96 pozos (Costar). Las variantes FVIIa y controles se procesaron por ensayo en triplicado. El sustrato mesil-dFPR-ACC se preparó hasta 1.1X la concentración final de 0.09 mM para conteo para la dilución 1:10 del polipéptido FVIIa en el sustrato. Para una placa de área media de 96 pozos, 20 mL de sustrato mesil-dFPR-ACC 0.1 mM se preparó en 1X solución amortiguadora de ensayo por dilución del sustrato madre almacenado en DMSO seco.

El ensayo se corrió en una estación de trabajo automatizado BioMek® FX (Beckman Coulter) equipada con una cabeza de 96 puntas (MBP BioRobotix ART® 130 µL puntas). La placa de ensayo (prescindida con 10 µL de las reacciones FVIIa/sTF) se colocó en cubierta de la estación de trabajo con un reservorio de canal sencillo rellenado con la solución 1.1X mesil-dFPR-ACC. La temperatura del lector de placa se ajustó

469

hasta 37°C. La estación de trabajo BioMek® FX inicia el ensayo al transferir 90 µL del reservorio de canal sencillo rellenado con 1.1X sustrato mesil-dFPR-ACC en cada pozo de la placa de ensayo negra que contiene 10 µL de FVIIa/sTF. Las concentraciones finales de las variantes FVIIa, sTF y concentración Mesil-dFPR-ACC en el ensayo fueron 10 nM, 50 nM y 0.09 mM, respectivamente. La estación de trabajo luego se mezcla 70 µL de la muestra 100 µL dos veces. La placa de ensayo negra se transfirió en un lector de placa SpectraMax Gemini (Molecular Devices) y las velocidades de reacción inicial se siguieron durante 10 min a 37°C.

Después de la terminación del ensayo, una placa que contiene una curva estándar de ACC libre (100 µL/pozo) se leyó en el mismo lector de placa SpectraMax Gemini y usó para proporcionar una conversión exacta de RFU/seg hasta µM/seg. La placa estándar se preparó como sigue. En todos los pozos "aún enumerados" (esto es cada segundo pozo) de la fila superior de una placa de ensayo de área media negra de 96 pozos, la muestra ACC 1 mM se diluyó hasta 25 nM en 1X solución amortiguadora de ensayo hasta un volumen final 200 µL (5 µL ACC 1 mM en 195 µL 1x Solución amortiguadora de ensayo). Cien µL de 1x Solución amortiguadora de ensayo se pipeteó en todos de los pozos restantes de las columnas "aún enumeradas". El sustrato ACC se diluyó en serie 1:1 bajando las aún columnas para generar 6 más concentraciones ACC. La última fila se dejó con solamente 100 µL 1x Solución amortiguadora de ensayo (esto es sin ACC). La fluorescencia se midió usando una versión de lectura de punto final de las condiciones de ensayo y una gráfica de

fluorescencia contra concentración de ACC se graficó. El alcance de la línea a través de estos puntos da el factor de conversión de RFU hasta µM.

El software SoftMax Pro (Molecular Devices) se usó para analizar los datos para el lector de placa así como la curva estándar. La clasificación que contiene los datos se guardó y exportó como una clasificación de texto ASCII, que se importó en el programa Microsoft Excel, procesó y analizó usando una plantilla creada en Microsoft Excel. Durante la importación los datos en la plantilla de Microsoft Excel, la conversión RFU/µM promedio se calculó del alcance de la curva estándar ACC y usó para proporcionar un factor de conversión que cambia los datos de la placa de RFU/seg para la medición de la actividad en µM/seg. Todos los valores en triplicado se evaluaron para valores extremos, que se excluyeron si es necesario. La actividad específica de cada variante FVIIa y controles de tipo silvestre se expresaron en las unidades de µmol/seg/µmol, y calcularon por las siguientes expresiones: datos promedio (RFU/seg) * factor de conversión (RFU/µM) = Actividad (en µM/seg) actividad específica (en µmol/seg/µmol) = [(µM/seg)* (100 µL)*(1/1000000)]/[(10 nM)*(100 µL)*(1/1000000)* (1/1000)]

La Tabla 28 establece la actividad específica de las variantes FVIIa que se procesaron por ensayo, incluyendo la actividad relativa al FVIIa de tipo silvestre. También se incluyen la desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (como un porcentaje; %CV). Diversas variantes FVIIa muestran actividad específica incrementada para escisión de Mesil-dFPR-ACC comparado con el polipéptido FVIIa de tipo silvestre. Por

ejemplo, Q366V-FVIIa muestra actividad específica para escisión de Mesil-dFPR-ACC que fue 4 veces mayor que aquel observado con la variante FVIIa de tipo silvestre. Las variantes FVIIa que contienen la mutación H373F también tienden a mostrar actividad específica incrementada para escisión de Mesil-dFPR-ACC comparado con el polipéptido FVIIa de tipo silvestre.

Tabla 28. Actividad específica de polipéptidos FVIIa para mesil-dFPR-ACC

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Actividad (µmol/ seg/µmol)	SD	% CV	Actividad (% TN)	n
TN (NovoSeven®)	TN (NovoSeven®)	2.31	0.34	0.15	100%	3
TN	TN	2.40	0.15	0.06	104%	4
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	2.50			108%	1
Gla intercambio FIX	Gla intercambio FIX	1.63			71%	1
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	2.24			97%	1
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A	1.95			85%	1
V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	3.28			142%	1
T128N/P129A/V158D/ E296V/M298Q	T[128]N/P[129]A/V21D/ E154V/M156Q	3.26			142%	1
S52A/S60A/V158D/ E296V/M1298Q	S[52]A/S[60]A/V21D/ E154V/M156Q	2.56			111%	1
Q286R	Q143R	1.24			54%	1
T128N/P129A/Q286R	T[128]N/P[129]A/Q143R	1.21			52%	1
S52A/S60A/Q286R	S[52]A/S[60]A/Q143R	0.44	0.11	0.25	19%	2
S222A	S82A	2.35			102%	1
T128N/P129A/S222A	T[128]N/P[129]A/S82A	2.70			117%	1
S52A/S60A/S222A	S[52]A/S[60]A/S82A	1.22			53%	1
H257S	H117S	2.64			115%	1
H373F	H224F	1.17			51%	1
Q366V	Q217V	9.29			403%	1
Gla intercambio FIX/Q366V	Gla intercambio FIX/Q217V	2.82			122%	1
K109N/A175S	K[109]N/A39S	3.38			147%	1
Q286R/H257A	Q143R/H117A	1.96			85%	1
Gla intercambio FIX/ T128N/P129A/ S222A/Q286R	Gla intercambio FIX/ T[128]N/P[129]A/ S82A/Q143R	0.53			23%	1
Gla intercambio FIX/	Gla intercambio FIX/	0.44	0.42	0.96	19%	2

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Actividad (µmol/ seg/µmol)	SD	% CV	Actividad (% TN)	n
S52A/S60A/S222A/ Q286R	S[52]A/S[60]A/S82A/ Q143R					
Q286R/M298Q	Q143R/M156Q	1.91	0.11	0.06	83%	5
Gla intercambio FIX Q286R/M298Q	Gla intercambio FIX Q143R/M156Q	1.53			66%	1
T128N/P129A/Q286R/ M298Q	T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q	1.80			78%	1
Gla intercambio FIX /T128N/P129A/Q286R/ M298Q	Gla intercambio FIX /T[128]N/P[129]A/Q143R/ M156Q	0.78			34%	1
{Gla intercambio FIX/E40L}/ Q286R/M298Q	{Gla intermcabio FIX/E[40]L}/ Q143R/M156Q	1.16			50%	1
{Gla intercambio FIX/K43I}/ Q286R/M298Q	{Gla intercambio FIX/K[43]I}/ Q143R/M156Q	1.20			52%	1
{Gla intercambio FIX/Q44S}/ Q286R/M298Q	{Gla swap FIX/Q[44]S}/ Q143R/M156Q	1.11			48%	1
{Gla intercambio FIX/M19K}/ Q286R/M298Q	{Gla intercambio FIX/M[19]K}/ Q143R/M156Q	1.26			55%	1
S52A/S60A/ Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/Q143R/ M156Q	1.08	0.17	0.15	47%	2
T128N/P129A/S222A/ H257A/Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/S82A/ H117A/Q143R/M156Q	1.66			72%	1
S52A/S60A/S222A/ H257A/Q286R/M298Q	S[52]A/S[60]A/S82A/H117 A/Q143R/M156Q	0.98			42%	1
H257S/Q286R/Q366V	H117S/Q143R/Q217V	2.00	0.17	0.08	87%	2
S222A/H257A/Q286R/ Q366V	S82A/H117A/Q143R/ Q217V	2.43			105%	1
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	2.35			102%	1
Q286R/H373F	Q143R/H224F	0.78			34%	1
T128N/P129A/ Q286R/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/ H224F	2.31			100%	1
S52A/S60A/ Q286R/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/ H224F	3.14			136%	1
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	4.59			199%	1

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Actividad (µmol/ seg/µmol)	SD	% CV	Actividad (% TN)	n
T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/H224F	2.83			123%	1
S52A/S60A/Q286R/M298Q/H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q/H224F	5.02			218%	1
M298Q/H373F	M156Q/H224F	4.00			174%	1
V21D/Q143R/E154V/M156Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	1.83			79%	1
S222A/T239V	S82A/T99V	1.91			83%	1
Gla intercambio FIX /S222A/T239V/Q286R	Gla intercambio FIX /S82A/T99V/Q143R	0.66			28%	1
T239V/Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	1.74			75%	1
Gla intercambio FIX T239V/Q286R/M298Q	Gla intercambio FIX T99V/Q143R/M156Q	1.13			49%	1
S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99V/H117A/Q143R /M156Q	1.66			72%	1
T239V/Q286R/H373F	T99V/Q143R/H224F	1.53			66%	1
T239V/Q286R/M298Q/H373F	T99V/Q143R/M156Q/H224F	3.07			133%	1
V158D/T239I/E296V/M298Q	V21D/T99I/E154V/M156Q	2.24			97%	1
T239I/Q286R	T99I/Q143R	0.88			38%	1
S222A/T239I	S82A/T99I	1.36			59%	1
Gla intercambio Fix/S222A/T239I/Q286R	Gla intercambio FIX /S82A/T99I/Q143R	0.25			11%	1
T239I/Q286R/M298Q	T99I/Q143R/M156Q	1.37			60%	1
Gla intercambio FIX/ T239I/Q286R/M298Q	Gla intercambio FIX /T99I/Q143R/M156Q	0.67			29%	1
S222A/T239I/H257A/Q286R/M298Q	S82A/T99I/H117A/Q143R/M156Q	1.41			61%	1
T239I/Q286R/H373F	T99I/Q143R/H224F	1.24			54%	1
V158D/T239V/E296V/M298Q	V21D/T99V/E154V/M156Q	2.19	0.15	0.07	95%	3
T239V/Q286R	T99V/Q143R	1.26	0.14	0.11	55%	2
T239I/Q286R/M298Q/	T99I/Q143R/M156Q/	1.59	0.21	0.13	69%	3

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Actividad (µmol/ seg/µmol)	SD	% CV	Actividad (% TN)	n
H237F	H224F					
H257S/Q286R/M298Q	H117S/Q143R/M156Q	1.85	0.23	0.13	80%	2
Glaintercambio FIX /Q286R/S222A/H257S	Glaintercambio FIX /Q143R/S82A/H117S	0.49	0.04	0.09	21%	2
S222A/H257S/Q286R/ M298Q	S82A/H117S/Q143R/ M156Q	1.77	0.23	0.13	77%	2
H257S/Q286R/M298Q/ H373F	H117S/Q143R/M156Q/ H224F	2.32	0.41	0.18	101%	3
S222A/Q286R/M298Q/ H373F	S82A/Q143R/M156Q/ H224F	2.79	0.39	0.14	121%	2
Gla intercambio FIX/S222A/ Q286R/M298Q/H373F	Gla intercambio FIX/S82A/ Q143R/ M156Q/H224F	1.92			83%	1
S222A/Q286R/M298Q	S82A/Q143R/M156Q	1.90			82%	1
Gla intercambio FIX/ S222A/Q286R/M298Q	Gla intercambio FIX S82A/Q143R/M156Q	1.12			49%	1
T128N/P129A/A175S/ Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/ Q217V	3.40			148%	1
A122N/G124S/A175S/ Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/ Q217V	2.34	0.22	0.09	101%	2
T128N/P129A/A175S/ S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/ S82A	3.19			138%	1
A122N/G124S/A175S/ S222A	A[122]N/G[124]S/A39S/ S82A	2.68	0.30	0.11	116%	2
T128N/P129A/A175S/ Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/ Q143R	1.88			81%	1
A122N/G124S/A175S/ Q286R	A[122]N/G[124]S/A39S/ Q143R	2.16	0.42	0.20	94%	2
Gla intercambio FIX/ S222A/Q286R/H373F	Gla intercambio FIX/ S82A/Q143R/H224F	1.37	0.26	0.19	60%	2
V158D/E296V/M298Q/ H373F	V21D/E154V/M156Q/ H224F	5.60			243%	1
H257A/Q286R/M298Q	H117A/Q143R/M156Q	2.18			95%	1
Gla intercambio FIX/ T128N/P129A/A175S/	Gla intercambio FIX/T[128]N/P[129]A/	0.75			32%	1

476

Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Actividad (µmol/ seg/µmol)	SD	% CV	Actividad (% TN)	n
S222A/Q286R	A39S/S82A/Q143R					
Gla intercambio FIX/ A122N/G124S/A175S/ S222A/Q286R	Gla intercambio FIX/ A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/Q143R	0.89			38%	1
T128N/P129A/A175S/ Q286R/M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156Q	2.02			88%	1
A122N/G124S/A175S/ Q286R/M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q	3.03			131%	1
T128N/P129A/A175S/ S222A/H257A/Q286R/ M298Q	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	2.18			95%	1
A122N/G124S/A175S/ S222A/H257A/Q286R/ M298Q	A[122]N/G[124]S/A39S/S82A/H117A/Q143R/M156Q	1.99			86%	1
T128N/P129A/A175S/ Q286R/M298Q/H373F	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R/M156Q/H224F	2.78			121%	1
A122N/G124S/A175S/ Q286R/M298Q/H373F	A[122]N/G[124]S/A39S/Q143R/M156Q/H224F	2.71			118%	1
V158D/Q286R/E296V/M 298Q/H373F	V21D/Q143R/E154V/M156 Q/H224F	1.89			82%	1

Ejemplo 15

Activación de FX y Determinación de la concentración de Proteasa Catalíticamente Activa usando el Fluoresceína-mono-p'-guanidinobenzoato de Titulación de Sitio Activo (FMGB)

La concentración de Factor X (FX), que es capaz de volverse catalíticamente activo, en una solución madre del cimógeno se determinó por activación de muestras FX con veneno de víbora Russell (RVV-asa) seguido por titulación del Factor X activo (FXa) con fluoresceína-mono-p'-guanidinobenzoato (FMGB), un sustrato de éster fluorogénico desarrollado como una titulación de sitio activo para serina proteasas tipo tripsina.

Después de la activación, el ensayo de titulación del sitio activo se llevo a cabo esencialmente como se describe por Bock et al. (Archives of Biochemistry y Biophysics (1989) 273:375-388) con unas pocas modificaciones menores. FMGB fácilmente reacciona con FXa, pero no FX o proteasa inactiva, para formar un intermediario de enzima acilo efectivamente estable bajo condiciones en las cuales la concentración de FMGB se satura y la desacilación es especialmente lenta y limita la velocidad para catálisis. Bajos estas condiciones, la proteasa FXa experimenta una vuelta catalítica sencilla para liberar el fluoróforo de fluoresceína. Cuando el estallido inicial de fluorescencia se calibra para una curva estándar de concentración externa de fluorescencia de fluoresceína, la concentración de sitios activos puede calcularse.

Las reacciones de activación FXa se prepararon en una concentración final de FX 10 µM (con base en la absorbancia A_{280} y un coeficiente de extinción de 1.16) en un volumen final de 50-100 µL en una solución amortiguadora de reacción que contiene Tris 100 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 5 mM, PEG 8000 al 0.1%, pH 8.1. La activación se inició por la adición de RVV-asa a una concentración final de 5 µg/mL (5 µL de una dilución 98 µg/mL por 100 µL de reacción o 2.5 µL por 50 µL de reacción) a 37°C durante 45-60 min de tiempo de activación (previamente determinado para representar la activación completa al recolectar muestras cada 15 min y probar el incremento en la escisión de sustrato fluorogénico Spectrafluor FXa). Las reacciones se apagaron con 1/10 volumen de solución amortiguadora apagada que contiene Tris 100 mM, NaCl 50 mM, 5

478

000448

mM, EDTA 100 mM, PEG 8000 al 0.1%, pH 8.1.

Los ensayos se realizaron con un volumen de reacción de 1 mL en una cubeta de cuarzo de 0.4 cm x 1 cm bajo agitación continua. Las reacciones contienen 100-400 nM del FXa activado frescamente y FMGB 5 µM en una solución amortiguadora de ensayo que contiene Hepes 30 mM, NaCl 135 mM, EDTA 1 mM y PEG 8000 al 0.1%, pH 7.4. La solución estándar de fluoresceína se preparó frescamente a una concentración madre de 70 mM en DMF y la concentración confirmada por espectroscopia de absorbancia bajo condiciones estándares en 496 nm usando un coeficiente de extinción de 89,125 M^{-1} cm^{-1} en NaOH 0.1 N. FMGB se preparó en una concentración madre de 0.01 M en DMF con base en el peso seco y la concentración confirmada por espectroscopia de absorbancia en 452 nm usando un coeficiente de extinción de 19,498 en solución amortiguadora salina de fosfato (PBS), pH 7.2. Los ensayos se iniciaron al agregar 5 µL de FMGB 1 mM (5 µM concentración final) hasta 1 x solución amortiguadora de ensayo y midiendo primero la hidrólisis de respaldo de FMGB durante ~150-200 segundos antes de la adición de FXa a una concentración final de ~100-400 nM con base en la concentración inicial determinada por la absorbancia antes de la activación por RW-asa (ver arriba). La liberación de fluorescencia de fluoresceína en la fase de estallido de la reacción se siguió durante unos 3600 segundos adicionales. Una curva estándar de fluoresceína libre se preparó por titulación del estándar de fluoresceína que calibra la absorbancia en 1x solución amortiguadora de ensayo en etapas 20 nM a una concentración final de 260-300 nM.

Para análisis de datos, los rastros de la reacción se importaron en el paquete de software Graphpad Prism y la contribución de la hidrólisis de respaldo se sustrajo de la curva por extrapolación de la velocidad medida inicial de hidrólisis FMGB espontanea, que fue típicamente menor que 5% del estallido de fluorescencia total. La curva corregida se fijo a una ecuación exponencial sencilla con un componente lineal (para conteo para la velocidad lenta de desacilación) de la forma ΔFluorescencia = $Amp(1-e^{-kt})+Bt$, donde Amp = la amplitud de la fase de estallido bajo las condiciones de ensayo saturadas resumidas arriba, k es la constante de velocidad de primer orden observado para la formación de la enzima acilo y B es una constante de velocidad de volumen asociada con vuelta completa de FMGB. La concentración de proteasa FXa activa se calculó por comparación del parámetro fijo para amplitud para la curva estándar de fluoresceína. Los valores de ensayos múltiples se midieron, promediaron y la desviación estándar se determina. La cantidad de FXa activo en la preparación por lo tanto representa directamente la concentración de FX en una preparación madre, que puede activarse por FVIIa. Este valor titulado del sitio activo se emplea cuando se calcula la concentración de FX a usarse en un ensayo indirecto tal como los ensayos dependientes de TF e independientes de TF descritos en el Ejemplo 4.

Ya que las modificaciones serán aparentes para aquellos de experiencia en la técnica, se pretende que esta invención se limite solamente por el alcance de las reivindicaciones anexas.

480

P-3735
Divisional de la p-2686
Rvs- abril 29,2013

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido del factor VII (FVII) modificado, en el que

el polipéptido del FVII tiene solamente hasta 7 reemplazos de aminoácidos en comparación con un polipéptido del FVII no modificado que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-3 y 18-74;

un reemplazo de aminoácido está en una posición correspondiente a la posición 286 en un polipéptido del FVII que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3; y

el reemplazo en la posición 286 es una reemplazo por arginina (Arg, R) que produce un polipéptido del FVII modificado que presenta una mayor actividad coagulante en comparación con el polipéptido del FVII que no tiene la modificación en la posición 286.

2. El polipéptido del FVII modificado de la reivindicación 1 que es un polipéptido FVIIa activado.

3. El polipéptido del FVII modificado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el polipéptido del FVII no modificado comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-3.

4. El polipéptido del FVII modificado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el polipéptido del FVII no modificado comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3.

000451

5. El polipéptido del FVII modificado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el polipéptido del FVII no modificado consiste de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3.

6 El polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las a reivindicaciones 1-5, que comprende el reemplazo de aminoácido 286R.

7. El polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las a reivindicaciones 1-6, en el que un reemplazo de aminoácido adicional al reemplazo correspondiente al reemplazo 286R está en una posición correspondiente a una posición seleccionada de entre 51, 52, 54, 60, 66, 68, 109 , 119, 122, 124, 130, 132, 158, 161, 175, 196, 197, 199, 202, 216, 222, 237, 239, 257, 286, 287, 290 292, 294, 296, 305, 314, 318, 321, 337, 341, 366, 373, 374, 394, 395 y 396.

8. El polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las a reivindicaciones 1-7, que comprende un reemplazo de aminoácidos seleccionado de entre D196K, D196R, D196A, D196Y, D196F, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, R290M, R290V, K341E, K341R, K341Q, K341N, K341M, K341D, T239S, T239N, T239Q, T239V, T239L, T239H, T239I, L287T, P321K, P321E, P321Y, P321S, Q366D, Q366E, Q366N, Q366T, Q366S, Q366V, Q366I, Q366L, Q366M, H373D, H373E, H373S, H373L, H373i, H373F, H373A, K161S, K161A, K161V, H216S, H216A, H216K, H216R, S222A, S222K, S222V, S222N, S222E, S222D, H257A, H257S, S52A, S60A, E394N, P395A, R396S, R202S, A292N, A294S, G318N, A175S, K109N, A122N, G124S, A51N, T130N, E132S, S52N, P54S, S119N, L121S, T128N, P129A, Q66N, Y68S, V158T, V158D, L287T y E296V.

9. El polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las a reivindicaciones 1-6, que comprende reemplazos de aminoácidos seleccionados de entre Q286R, Q286R/H257A, Q286R/S222A, Q286R/S222A/H257A, Q286R/S222A/Gla Intercambiar FIX, Q286R/H257A/Gla Intercambiar REVISIÓN , Q286R/S222A/H257A/Gla FIX intercambio, Q286R/Q366V, Q286R/A292N/A294S/Q366V, A175S/Q286R/Q366V, S222A/Q286R/Q366V, H257S/Q286R, H257S/Q286R/Q366V, S222A/H257A/Q286R / Q366V, Q286R/H373A, S222A/H257A/Q286R/M158Q, Q286R/K341D, Q286R/Q366D, Q286R/Q366N, Q286R/H373F, T128N/P129A/Q286R, T128N/P129A/Q286R/H373F, S52A/S60A/Q286R , S52A/S60A/Q286R/H373F /, T239V/Q286R, T239V/Q286R/H373F, T239I/Q286R/H373F, T128N/P129A/A175S/Q286R A122N/G124S/A175S/Q286R.

10. El polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las a reivindicaciones 1-9, que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 118, 131-137, 142-153, 279, 281, 285, 290, 292, 296, 299, 301, 305, 308, 310, 314, 316, 323, 334-336, 341 o 342.

11. Un polipéptido del FVII modificado, que comprende una modificación en un polipéptido del FVII, en el que la modificación está en una posición correspondiente a una posición seleccionada de entre 54, 66, 121, 122, 129 y 132 en un polipéptido del FVII que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3 o en los residuos correspondientes en un polipéptido del FVII.

12. El polipéptido del FVII modificado de la reivindicación 11, en el que la modificación se selecciona de entre P54S, Q66N, L121S, A122N, P129A y E132S.

P-3735
Divisional de la p-2686
Rvs- abril 29,2013

13. El polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende un dominio Gla heterólogo, o una parte suficiente del mismo para efectuar la unión a fosfolípidos.

14. El polipéptido del FVII modificado de la reivindicación 13, en el que el dominio Gla heterólogo se selecciona de entre un dominio Gla en el Factor IX (FIX), el factor X (FX), la protrombina, la proteína C, la proteína S, la osteocalcina, la proteína Gla de la matriz, la proteína 6 específica de suspensión del crecimiento (Gas6) y la proteína Z.

15. El polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 que comprende las modificaciones post-traduccionales.

16. El polipéptido del FVII modificado de la reivindicación 15, en el que las modificaciones post-traduccionales comprenden glicosilación.

17. El polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 que es un polipéptido FVIIa activado de dos cadenas.

18. El polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 que es un polipéptido maduro.

19. El polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 que es un polipéptido de una sola cadena o un polipéptido de dos cadenas.

000454

20. El polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 que tiene sólo tres reemplazos de aminoácidos, además del reemplazo Q286R en comparación con el polipéptido del FVII de una de las SEQ ID NOs: 1-3.

21. El polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 que tiene sólo tres reemplazos de aminoácidos, además del reemplazo Q286R en comparación con el polipéptido del FVII.

22. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 que tiene hasta cuatro reemplazos de aminoácidos además del reemplazo Q286R en comparación con el polipéptido del FVII.

23. Una molécula de ácido nucléico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-22.

24. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucléico de la reivindicación 23.

25. Una célula, que comprende el vector de la reivindicación 24.

26. Una composición farmacéutica, que comprende una concentración o cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, o una molécula de ácido nucléico de la reivindicación 23 o un vector de la reivindicación 24 o una célula de la reivindicación 25, en un vehículo farmacéuticamente aceptable .

000455

27. La composición farmacéutica de la reivindicación 26 que se formula para la administración en una sola dosis.

28. La composición farmacéutica de la reivindicación 26 o la reivindicación 27 que se formula para administración oral, nasal, bucal pulmonar, transdérmica, subcutánea, intraduodenal, enteral, parenteral, intravenosa o intramuscular.

29. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 26-28 que esta liofilizada.

30. Un polipéptido del FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, para uso en el tratamiento de una enfermedad o condición que se trata mediante la administración del FVII o un pro-coagulante.

31. El polipéptido del FVII modificado de la reivindicación 30, en el que la enfermedad o afección se trata mediante la administración de un zimógeno o una forma actica del FVII.

32. El polipéptido modificado del FVII de la reivindicación 30 o la reivindicación 31, en el que la enfermedad o condición a ser tratada se selecciona de entre trastornos de coagulación de la sangre, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilias, deficiencia de factor VII, trastornos de la coagulación, hemorragia quirúrgica, o hemorragia resultante por trauma .

33. El polipéptido del FVII modificado de la reivindicación 32, en el que la enfermedad o afección es hemofilia, es la hemofilia es hemofilia A o hemofilia B o hemofilia C.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan polipéptidos del factor VII modificados y usos de los mismos. Tales polipéptidos FVII incluyen el Factor Vila y otras formas de Factor VII. Entre los polipéptidos FVII modificados proporcionados están aquellos que tienen actividades alteradas típicamente actividad procoagulante alterada, incluyendo actividades procoagulantes incrementadas. Por lo tanto, tales polipéptidos son terapéuticos.

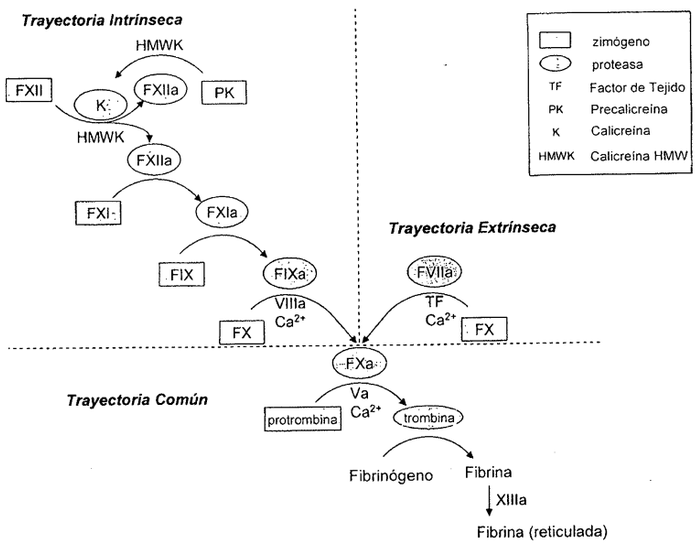
Trayectoria Intrínseca
HMWK
FXII
K
FXIIa
PK
HMWK
FXIIa
FXI
FXIa
FIX
FIXa
VIIIa
Ca2+
FX
Trayectoria Extrínseca
FVIIa
TF
Ca2+
FX
FXa
Va
Ca2+
Trayectoria Común
protrombina
trombina
Fibrinógeno
Fibrina
XIIIa
Fibrina (reticulada)
zimógeno
proteasa
TF Factor de Tejido
PK Precalicreína
K Calicreína
HMWK Calicreína HMW

Figura 1

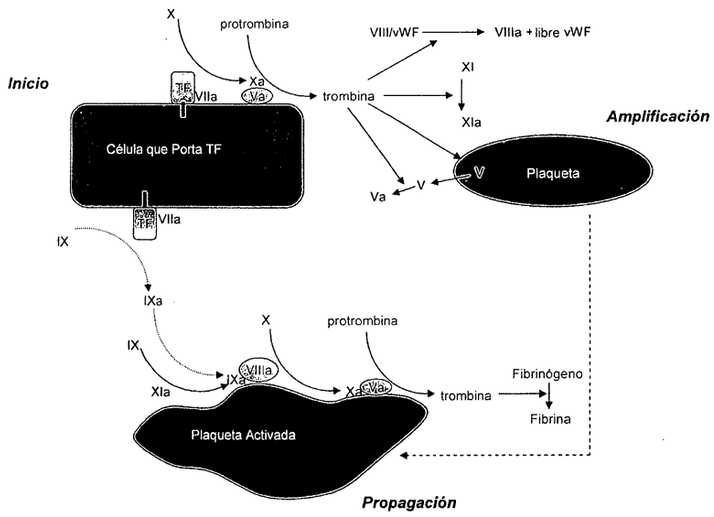
X
protrombina
VIII/vWF
VIIIa + libre vWF
Inicio
TF
VIIa
Xa
Va
trombina
XI
XIa
Amplificación
Célula que Porta TF
V
Plaqueta
Va
V
VIIa
IX
IXa
X
protrombina
IX
VIIIa
IXa
XIa
Xa
Va
trombina
Fibrinógeno
Fibrina
Plaqueta Activada
Propagación

Figura 2

000400

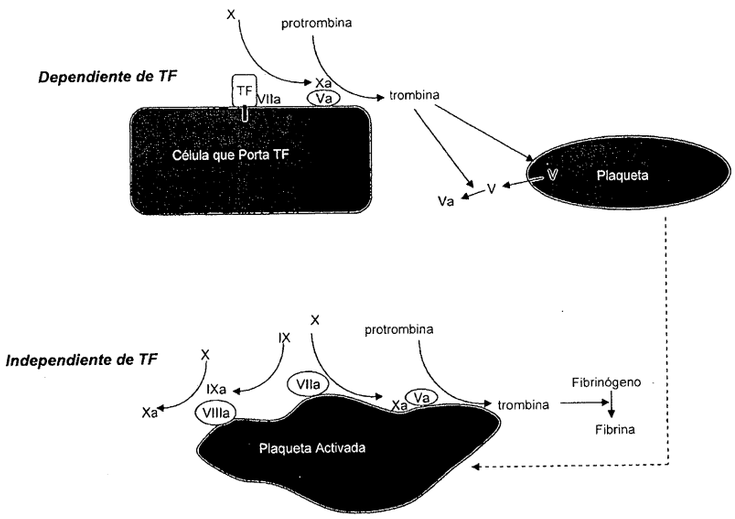

Figura 3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Catalyst Biosciences, Inc.
Edwin Madison
Christopher Thanos

<120> POLIPÉPTIDOS DE FACTOR VII QUE SE MODIFICAN
Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 3800003.00101 (4919PC)

<140> Desconocido
<141> Archivado adjunto

<150> 61/124,021
<151> 2008-04-11

<160> 371

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Isoforma a de precursor del factor VII

<400> 1

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
```

526

000461

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

<210> 2
<211> 444
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Isoforma b de precursor del factor VII

<400> 2

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
            20                  25                  30
Leu His Arg Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
        35                  40                  45
Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
    50                  55                  60
Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65                  70                  75                  80
Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
            100                 105                 110
Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
        115                 120                 125
Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
    130                 135                 140
Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
145                 150                 155                 160
Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
                165                 170                 175
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
            180                 185                 190
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
        195                 200                 205
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
    210                 215                 220
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
```

527

000402

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

<210> 3
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Factor VIIa maduro

<400> 3

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
```

528

000463

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

<210> 4
<211> 447
<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>
<223> Precursor del Factor VII

<400> 4
Met Leu Ser Gln Ala Trp Ala Leu Ala Leu Leu Cys Phe Leu Leu Ser
1 5 10 15
Leu Trp Gly Ser Leu Pro Ala Val Phe Leu Pro Gln Glu Gln Ala Leu
20 25 30
Ser Ile Leu His Arg Pro Arg Arg Ala Asn Gly Phe Leu Glu Glu Leu
35 40 45
Leu Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Arg Glu Glu Leu Cys Ser Phe
50 55 60
Glu Glu Ala His Glu Ile Phe Arg Asn Glu Glu Arg Thr Arg Gln Phe
65 70 75 80
Trp Val Ser Tyr Asn Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln
85 90 95
Asn Gly Gly Ser Cys Glu Asp Gln Leu Arg Ser Tyr Ile Cys Phe Cys
100 105 110
Pro Asp Gly Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr Asp Lys Gln Ser Gln
115 120 125
Leu Ile Cys Ala Asn Asp Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Gly Ala
130 135 140
Asp Pro Gly Ala Gly Arg Phe Cys Trp Cys His Glu Gly Tyr Ala Leu
145 150 155 160
Gln Ala Asp Gly Val Ser Cys Ala Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly
165 170 175
Lys Ile Pro Val Leu Glu Lys Arg Asn Gly Ser Lys Pro Gln Gly Arg
180 185 190
Ile Val Gly Gly His Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
195 200 205
Met Leu Lys Leu Asn Gly Ala Leu Leu Cys Gly Gly Thr Leu Val Gly
210 215 220
Pro Ala Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Glu Arg Leu Arg Ser
225 230 235 240
Arg Gly Asn Leu Thr Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Arg Val

529

000464

```
                245                 250                 255
Glu Gly Pro Glu Gln Glu Arg Arg Val Ala Gln Ile Ile Val Pro Lys
            260                 265                 270
Gln Tyr Val Pro Gly Gln Thr Asp His Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu
        275                 280                 285
Ala Gln Pro Val Ala Leu Gly Asp His Val Ala Pro Leu Cys Leu Pro
    290                 295                 300
Asp Pro Asp Phe Ala Asp Gln Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Ala
305                 310                 315                 320
Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Glu Arg Gly Val Thr Ala Arg Lys
                325                 330                 335
Leu Met Val Val Leu Val Pro Arg Leu Leu Thr Gln Asp Cys Leu Gln
            340                 345                 350
Gln Ser Arg Gln Arg Pro Gly Gly Pro Val Val Thr Asp Asn Met Phe
        355                 360                 365
Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser
    370                 375                 380
Gly Gly Pro His Ala Thr Arg Phe Arg Gly Thr Trp Phe Leu Thr Gly
385                 390                 395                 400
Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Ala Ala Gly His Phe Gly Ile
                405                 410                 415

Tyr Thr Arg Val Ser Arg Tyr Thr Ala Trp Leu Arg Gln Leu Met Gly
            420                 425                 430
His Pro Pro Ser Arg Gln Gly Phe Phe Gln Val Pro Leu Leu Pro
        435                 440                 445
```

<210> 5
<211> 446
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<223> Precursor del Factor VII

<400> 5

```
Met Val Pro Gln Ala His Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Leu Leu Gln
 1               5                  10                  15
Leu Gln Gly Pro Leu Gly Thr Ala Val Phe Ile Thr Gln Glu Glu Ala
            20                  25                  30
His Gly Val Leu His Arg Gln Arg Arg Ala Asn Ser Leu Leu Glu Glu
        35                  40                  45
Leu Trp Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Asn Glu Glu Gln Cys Ser
    50                  55                  60
Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Ser Pro Glu Arg Thr Lys Gln
65                  70                  75                  80
Phe Trp Ile Val Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Asn Pro Cys
                85                  90                  95
Gln Asn Gly Gly Thr Cys Gln Asp His Leu Lys Ser Tyr Val Cys Phe
            100                 105                 110
Cys Leu Leu Asp Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Lys Ser Lys Asn Glu
        115                 120                 125
Gln Leu Ile Cys Ala Asn Glu Asn Gly Asp Cys Asp Gln Tyr Cys Arg
    130                 135                 140
Asp His Val Gly Thr Lys Arg Thr Cys Ser Cys His Glu Asp Tyr Thr
145                 150                 155                 160
Leu Gln Pro Asp Glu Val Ser Cys Lys Pro Lys Val Glu Tyr Pro Cys
                165                 170                 175
Gly Arg Ile Pro Val Val Glu Lys Arg Asn Ser Ser Ser Arg Gln Gly
            180                 185                 190
Arg Ile Val Gly Gly Asn Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln
        195                 200                 205
Ala Val Leu Lys Ile Asn Gly Leu Leu Leu Cys Gly Ala Val Leu Leu
    210                 215                 220
Asp Ala Arg Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Phe Asp Asn Ile Arg
```

58

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

<210> 6
<211> 466
<212> PRT
<213> Pan paniscus

<220>
<223> Precursor del Factor VII

<220>
<221> UNSURE
<222> 228, 231
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 6
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Glu Ala Ser Gly Gly Glu Thr
20 25 30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Ile Thr Gln
35 40 45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
50 55 60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65 70 75 80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Leu Glu Arg
85 90 95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
100 105 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
115 120 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr Tyr
130 135 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145 150 155 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
165 170 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu

531

000466

```
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Asn Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205

Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Xaa Leu Leu Xaa Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Ala Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Ile Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Ala Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Ser Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 7
<211> 466
<212> PRT
<213> Troglodítas Pan

<220>
<223> Precursor del Factor VII

<220>
<221> INSEGURO
<222> 35, 36
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

```
<400> 7
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1                5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Glu Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Xaa Xaa Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Ile Thr Gln
        35                  40                  45

Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Leu Glu Arg
```

532

000465

```
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr Tyr
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Ile Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Ala Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Ser Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 8
<211> 444
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus

<220>
<223> Precursor del Factor VII

```
<400> 8
Met Ala Pro Gln Ala Arg Gly Leu Gly Leu Cys Ser Leu Leu Ala Leu
 1               5                  10                  15
Gln Ala Ser Leu Ala Ala Val Phe Ile Thr Gln Glu Glu Ala His Ser
            20                  25                  30
Val Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg
        35                  40                  45
```

537

000468

```
Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Leu Cys Ser Phe Glu
    50                  55                  60
Glu Ala Arg Glu Val Phe Gln Ser Thr Glu Arg Thr Lys Gln Phe Trp
65                  70                  75                  80
Ile Thr Tyr Asn Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Asn Pro Cys Gln Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Ser Cys Glu Asp Gln Ile Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu
            100                 105                 110
Ala Asp Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Lys Asn Lys Asn Asp Gln Leu
        115                 120                 125
Ile Cys Met Tyr Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His
    130                 135                 140
Val Gly Ser Gln Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Thr Leu Leu
145                 150                 155                 160
Pro Asn Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Asp Tyr Pro Cys Gly Lys
                165                 170                 175
Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Gly Ala Ser Asn Pro Gln Gly Arg Ile
            180                 185                 190
Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Ala
        195                 200                 205
Leu Met Asn Gly Ser Thr Leu Leu Cys Gly Gly Ser Leu Leu Asp Thr
    210                 215                 220
His Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Leu Ser Ser Leu
225                 230                 235                 240
Arg Asn Leu Thr Ile Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Glu
                245                 250                 255
Gly Asp Glu Gln Val Arg His Val Ala Gln Leu Ile Met Pro Asp Lys
            260                 265                 270
Tyr Val Pro Gly Lys Thr Asp His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Gln Pro Ala Ala Leu Thr Asn Asn Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu
    290                 295                 300
Arg Asn Phe Ser Glu Ser Thr Leu Ala Thr Ile Arg Phe Ser Arg Val
305                 310                 315                 320
Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Tyr Arg Gly Ala Leu Ala Arg Glu Leu
                325                 330                 335
Met Ala Ile Asp Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Val Glu Gln
            340                 345                 350
Ser Glu His Lys Pro Gly Ser Pro Glu Val Thr Gly Asn Met Phe Cys
        355                 360                 365
Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Ser Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser Gly
    370                 375                 380

Gly Pro His Ala Thr Ser Tyr His Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Val
385                 390                 395                 400
Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Ala Val Gly His Val Gly Val Tyr
                405                 410                 415
Thr Arg Val Ser Arg Tyr Thr Glu Trp Leu Ser Arg Leu Met Arg Ser
            420                 425                 430
Lys Leu His His Gly Ile Gln Arg His Pro Phe Pro
        435                 440
```

<210> 9
<211> 446
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<220>
<223> Precursor del Factor VII

```
<400> 9
Met Val Pro Gln Thr His Gly Leu Leu Leu Leu Tyr Phe Leu Leu Gln
 1                  5                  10                  15
Leu Gln Gly Pro Leu Gly Ala Val Val Phe Ile Thr Gln Glu Glu Ala
            20                  25                  30
```

534

000459

```
His Gly Val Leu His Arg Gln Arg Arg Ala Asn Ser Leu Leu Glu Glu
        35                  40                  45
Leu Trp Ser Ser Ser Leu Glu Arg Glu Cys Asn Glu Glu Arg Cys Ser
    50                  55                  60
Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Ser Pro Glu Arg Thr Lys Gln
65                  70                  75                  80
Phe Trp Thr Ile Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Asn Pro Cys
                85                  90                  95
Gln Asn Gly Gly Thr Cys Gln Asp His Leu Lys Ser Tyr Val Cys Phe
            100                 105                 110
Cys Pro Leu Asp Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Lys Asn Lys Asn Glu
        115                 120                 125
Gln Leu Ile Cys Ala Asn Glu Asn Gly Asp Cys Asp Gln Tyr Cys Arg
    130                 135                 140
Asp His Val Gly Thr Lys Arg Thr Cys Ser Cys His Glu Asp Tyr Val
145                 150                 155                 160
Leu Gln Pro Asp Glu Val Ser Cys Lys Pro Lys Val Glu Tyr Pro Cys
                165                 170                 175
Gly Arg Ile Pro Val Val Glu Lys Arg Asn Phe Ser Arg Pro Gln Gly
            180                 185                 190
Arg Ile Val Gly Gly Tyr Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln
        195                 200                 205
Ala Val Leu Lys Phe Asn Glu Ala Leu Leu Cys Gly Ala Val Leu Leu
    210                 215                 220
Asp Thr Arg Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Phe Gly
225                 230                 235                 240
Lys Leu Val Asn Ile Thr Val Val Leu Gly Glu His Asp Phe Ser Glu
                245                 250                 255
Lys Glu Gly Thr Glu Gln Val Arg Leu Val Glu Gln Val Ile Met Pro
            260                 265                 270
Asn Lys Tyr Thr Arg Gly Arg Thr Asp His Asp Ile Ala Leu Val Arg
        275                 280                 285
Leu His Arg Pro Val Thr Phe Thr Asp Tyr Val Val Pro Leu Cys Leu
    290                 295                 300
Pro Glu Arg Ala Phe Ser Glu Asn Thr Leu Ala Ser Ile Arg Phe Ser
305                 310                 315                 320
Arg Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu
                325                 330                 335
Glu Leu Met Val Ile Glu Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu
            340                 345                 350
Glu His Ala Lys His Ser Ala Asn Thr Pro Arg Ile Thr Glu Asn Met
        355                 360                 365
Phe Cys Ala Gly Tyr Met Asp Gly Thr Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp
    370                 375                 380
Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr His Gly Thr Trp Tyr Leu Thr
385                 390                 395                 400
Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Ala Ile Gly His Ile Gly
                405                 410                 415
Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Asp Trp Leu Val Lys Tyr Met
            420                 425                 430
Asp Ser Lys Leu Arg Val Gly Ile Ser Arg Val Ser Leu Leu
        435                 440                 445
```

<210> 10
<211> 469
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<220>
<223> Precursor del Factor VII

<400> 10

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

535

```
            20                  25                  30
Pro Gln Glu Glu Lys Thr Gln Asp Leu Leu Trp Lys Pro Gly Pro His
        35                  40                  45
Arg Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Gln
    50                  55                  60
Arg Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu
65                  70                  75                  80
Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile
                85                  90                  95
Phe Lys Asp Leu Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp
            100                 105                 110
Gly Asp Gln Cys Ala Ser Asn Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys
        115                 120                 125
Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ser Phe Glu Gly
    130                 135                 140
Arg Asn Tyr Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly
145                 150                 155                 160
Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Ala Gly Ala Lys Arg Ser Cys Trp
                165                 170                 175
Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Met Pro
            180                 185                 190
Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn
        195                 200                 205
Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Arg Val Cys Pro Lys
    210                 215                 220
Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu
225                 230                 235                 240
Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His
                245                 250                 255
Cys Phe Asp Lys Ile Lys Ser Trp Arg Asn Leu Thr Ala Val Leu Gly
            260                 265                 270
Glu His Asp Leu Ser Glu His Glu Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val
        275                 280                 285
Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Leu Gly Ala Thr Asn His
    290                 295                 300
Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Gln Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His
305                 310                 315                 320
Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Met Phe Ser Glu Arg Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp
            340                 345                 350
Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Ala Leu Asn Val Pro Arg Leu
        355                 360                 365
Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Gln Lys Ala Glu Ala Ser Pro
    370                 375                 380
Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Arg
385                 390                 395                 400
Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr Arg Tyr Arg
                405                 410                 415
Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala
            420                 425                 430
Ala Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu
        435                 440                 445
Trp Leu Gln Lys Leu Met His Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu
    450                 455                 460
Arg Ala Pro Phe Pro
465
```

<210> 11
<211> 445
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<220>
<223> Precursor del Factor VII (isoforma b)

536

<400> 11
Met Ala Ser Leu Arg Pro Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Cys Leu Gln
1 5 10 15
Gly Ser Leu Ala Ala Val Phe Val Gly His Glu Glu Ala His Ser Leu
20 25 30
Leu His Arg Phe Arg Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Trp Pro
35 40 45
Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Arg Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
50 55 60
Ala Arg Glu Ile Phe Lys Ser Glu Glu Arg Thr Arg Gln Phe Trp Val
65 70 75 80
Ser Tyr Asn Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly
85 90 95
Gly Ser Cys Glu Asp Gln Leu Gln Ala Tyr Ile Cys Phe Cys Pro Glu
100 105 110
Gly Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr Asn Lys Lys Ser Gln Leu Ile
115 120 125
Cys Met Asn Asp Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Ala
130 135 140
Glu Ala Gly Arg Ser Cys Trp Cys His Glu Gly Tyr Ala Leu Gln Glu
145 150 155 160
Asp Gly Val Ser Cys Glu Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
165 170 175
Pro Val Leu Glu Lys Arg Asn Asp Ser Asn Pro Gln Gly Arg Ile Val
180 185 190
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Met Leu
195 200 205
Lys Leu Lys Gly Ala Leu Leu Cys Gly Gly Thr Leu Leu Asn Thr Ser
210 215 220
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Arg Ile Arg Ser Trp Lys
225 230 235 240
Asp Leu Thr Val Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Lys Asp Glu Gly
245 250 255
Asp Glu Gln Glu Arg Pro Val Ala Gln Val Phe Val Pro Asp Lys Tyr
260 265 270
Val Pro Gly Lys Thr Asp His Asp Leu Ala Leu Val Arg Leu Ala Arg
275 280 285
Pro Val Ala Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300
Ser Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Ile Arg Phe Ser Ala Val Ser
305 310 315 320
Gly Trp Gly Arg Leu Leu Asp Arg Gly Ala Lys Ala Arg Val Leu Met
325 330 335
Ala Ile Gln Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Glu Gln Ala
340 345 350
Arg Arg Arg Pro Gly Ser Pro Ser Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala
355 360 365
Gly Tyr Leu Asp Gly Ser Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380
Pro His Ala Thr Arg Phe Arg Gly Thr Trp Phe Leu Thr Gly Val Val
385 390 395 400
Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Ala Thr Gly Arg Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415
Arg Val Ser Arg Tyr Thr Ala Trp Leu Leu Gly Leu Met Ser Ala Pro
420 425 430
Pro Pro Pro Ser Glu Gly Leu Leu Arg Ala Pro Leu Pro
435 440 445

<210> 12
<211> 446
<212> PRT
<213> Canis familiaris

<220>

537

<223> Precursor del Factor VII

<400> 12

```
Met Val Ala Trp Ala Gly Glu Leu Ala Leu Leu Cys Phe Leu Leu Gly
 1               5                  10                  15
Leu Gln Gly Ser Leu Ala Ala Val Phe Leu Thr Gln Glu Glu Ala Gln
            20                  25                  30
Gly Val Leu His Arg Gln Arg Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu
        35                  40                  45
Arg Ala Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Arg Glu Glu Gln Cys Ser Phe
    50                  55                  60
Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Gln Asp Val Asp Arg Thr Arg Gln Phe
65                  70                  75                  80
Trp Ile Ser Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Asn Pro Cys Gln
                85                  90                  95
Asn Gly Gly Ser Cys Glu Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys
            100                 105                 110
Pro Asp Asp Phe Gln Gly Arg Asn Cys Glu Thr Asp Lys Lys Asp Gln
        115                 120                 125
Leu Ile Cys Met Asn Glu Asn Gly Gly Cys Gln Gln Tyr Cys Ser Asp
    130                 135                 140
His Ala Glu Ala Arg Arg Ser Cys Trp Cys His Glu Gly Tyr Thr Leu
145                 150                 155                 160
Gln Asp Asp Gly Val Ser Cys Met Pro Ile Val Glu Tyr Pro Cys Gly
                165                 170                 175
Lys Ile Pro Val Leu Glu Lys Arg Ile Gly Ser Asn Pro Gln Gly Arg
            180                 185                 190
Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
        195                 200                 205
Ala Val Lys Val Asp Gly Lys Leu Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asp
    210                 215                 220
Ala Ala Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Glu Arg Ile Lys Asn
225                 230                 235                 240
Trp Lys Asn Leu Thr Val Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Asp
                245                 250                 255
Asp Gly Asp Glu Gln Glu Arg His Val Ala Arg Val Ile Val Pro Asp
            260                 265                 270
Lys Tyr Ile Pro Leu Lys Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu His Leu
        275                 280                 285
Arg Thr Pro Val Ala Tyr Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro
    290                 295                 300
Glu Lys Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Ile Arg Phe Ser Thr
305                 310                 315                 320
Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Gln
                325                 330                 335
Leu Met Ala Ile Asp Val Pro Arg Val Met Thr Gln Asp Cys Gln Glu
            340                 345                 350
Gln Ser Arg Arg Arg Ser Gly Ser Pro Ala Ile Thr Glu Asn Met Phe
        355                 360                 365
Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Ser Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser
    370                 375                 380
Gly Gly Pro His Ala Thr Lys Phe Gln Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly
385                 390                 395                 400
Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Ala Glu Gly His Phe Gly Val
                405                 410                 415
Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Arg Gln Leu Met Val
            420                 425                 430
Ser Ser His Thr Leu Arg Gly Leu Leu Arg Ala Pro Leu Pro
        435                 440                 445
```

<210> 13
<211> 433
<212> PRT
<213> Brachydanio rerio

<220>
<223> Precursor del Factor VII

<400> 13

```
Met Ser Leu Leu Leu Val Phe Ser Val Leu Trp Ser Leu His Tyr Cys
 1               5                  10                  15
His Ser Ala Ala Val Phe Val His Arg Asp Glu Ala His Glu Val Leu
            20                  25                  30
Ile Arg Ser Lys Arg Ala Asn Ser Gly Trp Phe Glu Glu Leu Lys Thr
        35                  40                  45
Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Leu Glu Glu Lys Cys Ser Tyr Glu Gly
    50                  55                  60
Ala Arg Glu Val Phe Glu His Thr Glu Ala Thr Asn Glu Phe Trp Lys
65                  70                  75                  80
Ile Tyr Asp Val Lys Asp His Cys Ala Ser Ser Pro Cys Glu His Asp
                85                  90                  95
Gly Leu Cys Thr Thr Gln Asn Ala Asp Ser Tyr Met Cys Leu Cys Ala
            100                 105                 110
Pro Gly Phe Ser Gly Arg His Cys Glu Gln Ser Ile Gly Asp Val Pro
        115                 120                 125
Asp Ser Cys Leu His Asp Asn Gly Gly Cys Glu His Phe Cys Thr Glu
    130                 135                 140
Gln Asp Gly Arg Arg Asn Cys Ser Cys Ala Asp Gly Tyr Tyr Leu Asp
145                 150                 155                 160
Asn Gly Gly Gln Lys Cys Arg Ser His Glu Val Phe Pro Cys Gly Lys
                165                 170                 175
Val Pro Leu Leu Gln Ala Gly Lys Ala Ala Asp His Gln Val Asp Leu
            180                 185                 190
Arg Ser Arg Ile Val Gly Gly Ser Glu Cys Pro Lys Gly His Cys Pro
        195                 200                 205
Trp Gln Val Leu Leu Lys Tyr Gly Glu Lys Gly Phe Cys Gly Gly Val
    210                 215                 220
Ile Tyr Lys Pro Thr Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys
225                 230                 235                 240
Leu Lys Val Lys Phe Leu Arg Ile Val Ala Gly Glu His Asp Leu Glu
                245                 250                 255
Val Asp Glu Gly Thr Glu Gln Leu Ile Gln Val Asp Gln Met Phe Thr
            260                 265                 270
His Pro Ala Tyr Val Ser Glu Thr Ala Asp Ser Asp Ile Ala Leu Leu
        275                 280                 285
Arg Leu Arg Thr Pro Ile Val Tyr Ser Val Tyr Ala Val Pro Val Cys
    290                 295                 300
Leu Pro Leu Arg Glu Met Ala Glu Arg Glu Leu Trp Ala Val Ser Lys
305                 310                 315                 320
His Thr Val Ser Gly Trp Gly Lys Arg Ser Glu Asp Gly Pro Thr Ser
                325                 330                 335
Arg Leu Leu Arg Arg Leu Leu Val Pro Arg Ile Arg Thr Gln Glu Cys
            340                 345                 350
Val Gln Val Ser Asn Leu Thr Leu Thr Ser Asn Met Phe Cys Ala Gly
        355                 360                 365
Tyr Ile Glu Gly Arg Gln Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro
    370                 375                 380
Leu Val Thr Arg Tyr Arg Asp Thr Ala Phe Leu Leu Gly Ile Val Ser
385                 390                 395                 400

Trp Gly Lys Gly Cys Ala Arg Pro Gly Ser Tyr Gly Ile Tyr Thr Arg
                405                 410                 415
Val Ser Asn Tyr Leu Gln Trp Ile Arg Gln Thr Thr Asn Thr Thr Ile
            420                 425                 430
His
```

<210> 14
<211> 441
<212> PRT

<213> Fugu rubripes

<220>
<223> Precursor del Factor VII

<400> 14
```
Met Arg Leu Arg Val Phe Phe Thr Leu Val Phe Thr Phe Thr His Cys
 1               5                  10                  15
Arg Ala Ala Ser Val Phe Leu Asp Ala Asp Lys Ala His Asp Val Leu
            20                  25                  30
Val Arg Thr Arg Arg Tyr Asn Ser Gly Trp Leu Glu Glu Leu Gln Lys
        35                  40                  45
Gly Asp Leu Lys Arg Glu Cys Leu Glu Glu Ile Cys Ser Tyr Glu Glu
    50                  55                  60
Ala Arg Glu Val Phe Glu His Thr Lys Thr Thr Asp Glu Phe Trp Lys
65                  70                  75                  80
Ile Tyr Asn Arg Pro Asn Ser Cys Lys Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Ser Cys Ser Ala Glu Gly Ser Ser Tyr Thr Cys Phe Cys Leu Pro
            100                 105                 110
Glu Phe Ser Gly Val Asp Cys Glu Leu Glu Tyr Gln Thr Val Pro Asp
        115                 120                 125
Thr Cys Leu Leu Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Phe Cys His Glu Asn
    130                 135                 140
Ser Ala Gly Gln Arg Gly Asn Cys Ser Cys Ala Asp Gly Tyr Asp Leu
145                 150                 155                 160
Asp Val Asp Gly Leu Ser Cys Lys Ala Lys Glu Ser Val Ala Cys Gly
                165                 170                 175
Met Val Leu Ser Ala Gln Phe Glu His Asn Gln Leu Asn Pro Arg Ala
            180                 185                 190
Arg Ile Val Gly Gly Asn Glu Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln
        195                 200                 205
Val Leu Leu Val Tyr Lys Gly Lys Gly Phe Cys Gly Gly Val Ile Tyr
    210                 215                 220
Lys Pro Thr Trp Ile Leu Thr Ala Ser His Cys Met Ala Asp Ile Asp
225                 230                 235                 240
Val Gln Phe Leu Lys Val Val Ala Gly Glu His Asn Thr Glu Val Asp
                245                 250                 255
Glu Gly Thr Glu Gln Ile Ile Gln Val Ser Glu Ile Ile Met His Glu
            260                 265                 270
Lys Tyr Val Pro Arg Thr Ala Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu His Leu
        275                 280                 285
Ala Val Pro Ile Thr Tyr Thr Thr Tyr Ala Ile Pro Val Cys Leu Pro
    290                 295                 300
Thr Arg Pro Leu Ala Glu Arg Glu Leu Trp Ala Val Ser Leu His Thr
305                 310                 315                 320
Val Ser Gly Trp Gly Arg Arg Ser Glu Asn Gly Pro Thr Ser His Leu
                325                 330                 335
Leu Arg Gln Leu Lys Val Pro Arg Ile Arg Thr Gln Gln Cys Ile Glu
            340                 345                 350
Glu Ser Gly Val Val Leu Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Met
        355                 360                 365
Glu Gly Arg Gln Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val
    370                 375                 380
Thr Lys Tyr Lys Lys Thr Val Phe Leu Leu Gly Ile Val Ser Trp Gly
385                 390                 395                 400
Lys Gly Cys Ala Arg Pro Gly Asn Tyr Gly Ile Tyr Thr Arg Val Ala
                405                 410                 415
Asn Tyr Leu Glu Trp Ile His Asn Arg Thr Ala Thr Val Asn Gln Pro
            420                 425                 430
Thr Asn Asn Thr Glu Asn Phe Thr Thr
        435                 440
```

<210> 15
<211> 425

510

<212> PRT
<213> Gallus gallus

<220>
<223> Precursor del Factor VII

<400> 15
Met Val Ser Arg Gln Cys Val Ala Leu Leu Leu Cys Phe Pro Leu Leu
 1   5   10   15
Val Pro Pro Ser Leu Glu Ala Val Phe Leu Lys Gln Glu Glu Ala Asn
            20   25   30
Ser Ile Phe Gln Arg His Arg Arg Ala Asn Ser Phe Phe Glu Glu Ile
        35   40   45
Lys Leu Gly Pro Leu Glu Arg Glu Cys Ile Glu Glu Lys Cys Ser Phe
    50   55   60
Glu Glu Ala Arg Glu Ile Tyr Arg Asp Asp Glu Arg Thr Lys Glu Phe
65   70   75   80
Trp His Ile Tyr Ser Asp Pro Asn Gln Cys Asp Ser Ser Pro Cys Gln
                85   90   95
Asn Gly Gly Ser Cys Asp Asp Gln Phe Gln Asp Tyr Val Cys Arg Cys
            100   105   110
Pro Pro Glu Tyr Glu Gly Lys Ser Cys Glu Thr Ala Val Ala Glu Asn
        115   120   125
Leu Lys Cys Ile Tyr Asp Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ala Asp
    130   135   140
Glu Gln Ser Glu Lys Arg Val Cys Phe Cys Ala Glu Gly Tyr Ala Leu
145   150   155   160
Ala Ser Asp Gly Val Ser Cys Ile Pro Gln Val Lys Tyr Pro Cys Gly
                165   170   175
Thr Ile Pro Val Leu Ala Arg Lys Asn Thr Thr Ala Gln Gly Arg Ile
            180   185   190
Val Gly Gly Val Thr Cys Pro Pro Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu
        195   200   205
Ile Ile Gln Asp Gln Lys Gly Lys Cys Gly Gly Ser Leu Leu Ser Pro
    210   215   220
Glu Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Leu Asp Tyr Ala His Ser Lys
225   230   235   240
Gln Leu Arg Val Arg Leu Gly Glu Tyr Ser Val Lys Val Ala Glu Lys
                245   250   255
Thr Glu Gln Glu Ser Gly Val Ser Lys Ile Ile Arg His Glu Glu Tyr
            260   265   270
Thr Ile Gly Gln Val Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Glu Thr
        275   280   285
Pro Val Asn Leu Thr Asp Phe Val Val Pro Ile Cys Leu Pro Glu Lys
    290   295   300
Arg Phe Ala Val Tyr Glu Leu Ser Ser Ile Lys Phe Ser Met Val Ser
305   310   315   320
Gly Trp Gly Arg Leu Leu Asp Gly Gly Ala Thr Ser Thr Phe Leu Met
                325   330   335
Arg Val His Leu Pro Arg Val Lys Thr Gln Glu Cys Glu Lys Gln Ala
            340   345   350
Asn Leu Asn Ile Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Asp Leu Thr Gly
        355   360   365
Lys Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr Lys
    370   375   380
Tyr Lys Asn Thr Trp Phe Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Lys Gly
385   390   395   400
Cys Ala Val Glu Gly Ser Tyr Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Arg Tyr
                405   410   415
Ile Asn Trp Leu Lys Arg His Met Glu
            420   425

<210> 16
<211> 444
<212> PRT

541

<213> Pongo pygmaeus

<220>
<223> Factor VII (fragmento)

<400> 16
Gly Val Ala Glu Ala Ser Gly Gly Glu Thr Arg Asp Met Gln Trp Lys
1 5 10 15
Leu Gly Pro His Arg Val Phe Ile Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20 25 30
Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Thr Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
35 40 45
Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
50 55 60
Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Leu Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65 70 75 80
Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
85 90 95
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
100 105 110
Asp Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Met Tyr Lys Asp Asp Gln Leu Ile
115 120 125
Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Met
130 135 140
Gly Ala Lys Arg Ser Cys Trp Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
145 150 155 160
Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
165 170 175
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
180 185 190
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
195 200 205
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
210 215 220
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
225 230 235 240
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Arg Asp Gly
245 250 255
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
260 265 270
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
275 280 285
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335
Ala Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380
Pro His Ala Thr Arg Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385 390 395 400
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Ala Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Cys Ser Glu
420 425 430
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
435 440

<210> 17
<211> 221

542

<212> PRT
<213> Gorilla gorilla

<220>
<223> Factor VII (fragmento)

<220>
<221> INSEGURO
<222> 172, 177
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 17
Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp
 1   5   10   15
Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp
            20   25   30
Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Met
        35   40   45

Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His
    50   55   60
Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu
65   70   75   80
Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val
                85   90   95
Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu
            100   105   110
Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln
        115   120   125
Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys
    130   135   140
Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly
145   150   155   160
Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Xaa Leu Thr Gly Ile
                165   170   175
Xaa Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr
            180   185   190
Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser
        195   200   205
Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
    210   215   220

<210> 18
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII L13P

<400> 18
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Pro Gly Leu Gln
 1   5   10   15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20   25   30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35   40   45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50   55   60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65   70   75   80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85   90   95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100   105   110

540

000478

```
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 19
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor F64L)

<400> 19

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

544

```
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 20
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor L73Q)

<400> 20
```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
```

545

```
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Gln Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415

Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465


<210> 21
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor E79Q)
```

546

<400> 21
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
20 25 30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
35 40 45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
50 55 60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Gln Glu
65 70 75 80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
85 90 95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
100 105 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
115 120 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
130 135 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145 150 155 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
165 170 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
180 185 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
195 200 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
210 215 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225 230 235 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
245 250 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
260 265 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
275 280 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
290 295 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305 310 315 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
325 330 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
340 345 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
355 360 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
370 375 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385 390 395 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
405 410 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
420 425 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
435 440 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
450 455 460
Phe Pro
465

<210> 22
<211> 466

54A

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor S120P)

<400> 22

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Pro Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
```

465

<210> 23
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor C121F)

<400> 23
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
20 25 30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
35 40 45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
50 55 60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65 70 75 80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
85 90 95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
100 105 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Phe Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
115 120 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
130 135 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145 150 155 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
165 170 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
180 185 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
195 200 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
210 215 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225 230 235 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
245 250 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
260 265 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
275 280 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
290 295 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305 310 315 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
325 330 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
340 345 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
355 360 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
370 375 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385 390 395 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
405 410 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
420 425 430

549

000484

```
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 24
<211> 466
<212> PRT
<213> Hmo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor L125P)

<400> 24

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Pro Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
```

55

```
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 25
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor Y128C)

<400> 25

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Cys
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
```

55

```
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 26
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor R139K)

<400> 26

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

Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
```

55

000487

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

<210> 27
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor R139Q)

```
<400> 27
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45

Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Gln Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
```

553

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

<210> 28
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII R139W

<400> 28
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
20 25 30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
35 40 45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
50 55 60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65 70 75 80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
85 90 95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
100 105 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
115 120 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Trp Asn Cys Glu Thr His
130 135 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145 150 155 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
165 170 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
180 185 190

551

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

Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 29
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor C151S)

<400> 29

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
```

55

```
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Ser Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255

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

<210> 30
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor E154K)

<400> 30

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
```

556

```
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Lys Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 31
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor G157C)

<400> 31
```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
```

55

```
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Cys Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 32
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor G157S)

<400> 32
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln

```
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Ser Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365

Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 33
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55

<220>
<223> Variante FVII (precursor G157V)

<400> 33
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
20 25 30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
35 40 45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
50 55 60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65 70 75 80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
85 90 95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
100 105 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
115 120 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
130 135 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Val Cys Glu Gln
145 150 155 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
165 170 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
180 185 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
195 200 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
210 215 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225 230 235 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
245 250 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
260 265 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
275 280 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
290 295 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305 310 315 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
325 330 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
340 345 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
355 360 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
370 375 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385 390 395 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
405 410 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
420 425 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
435 440 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
450 455 460
Phe Pro
465

560

000495

<210> 34
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor Q160R)

<400> 34

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Arg
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
```


000496

```
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465


<210> 35
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor P194T)

<400> 35
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Thr Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
```

562

000497

```
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 36
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor C195R)

<400> 36

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Arg Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
```

563

000498

```
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 37
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor K197E)

<400> 37

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Glu Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
```

SGU

000499

```
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 38
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor R212Q)

<400> 38

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Gln Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
```

565

000500

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

<210> 39
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor G216D)

```
<400> 39
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Asp Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
```

566

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

<210> 40
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor C238Y)

<400> 40

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

567

```
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Tyr Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 41
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor T241N)

<400> 41

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

568

000503

```
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Asn Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 42
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor C254Y)

<400> 42

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


000504

```
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125

Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Tyr Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 43
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor A266T)

<400> 43

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
```

```
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Thr Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445

Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 44
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor R283W)

<400> 44

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Trp Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320

Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 45

<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor V295D)

<400> 45

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

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

577

Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
450 455 460
Phe Pro
465

<210> 46
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor D302H)

<400> 46
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
20 25 30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
35 40 45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
50 55 60

Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65 70 75 80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
85 90 95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
100 105 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
115 120 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
130 135 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145 150 155 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
165 170 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
180 185 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
195 200 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
210 215 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225 230 235 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
245 250 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
260 265 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
275 280 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His His Ile Ala
290 295 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305 310 315 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
325 330 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
340 345 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
355 360 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
370 375 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys

000509

385 390 395 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
405 410 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
420 425 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
435 440 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
450 455 460
Phe Pro
465

<210> 47
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor D302N)

<400> 47
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
20 25 30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
35 40 45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
50 55 60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65 70 75 80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
85 90 95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
100 105 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
115 120 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
130 135 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145 150 155 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
165 170 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
180 185 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
195 200 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
210 215 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225 230 235 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
245 250 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
260 265 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
275 280 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asn Ile Ala
290 295 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305 310 315 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
325 330 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala

505

```
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 48
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor A304T)

```
<400> 48
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270

Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
```

000511

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

<210> 49
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor A304V)

```
<400> 49
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1                5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140

Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
```

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

<210> 50
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor R307C)

<400> 50

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

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

518

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

Phe Pro
465


<210> 51
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor R307H)


<400> 51
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
```

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

Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 52
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor V312M)

<400> 52

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

58

```
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205

Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Met Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 53
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor E325K)

<400> 53
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln

581

```
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80

Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Lys Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 54
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

582

<220>
<223> Variante FVII (precursor T332M)

<400> 54
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
20 25 30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
35 40 45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
50 55 60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65 70 75 80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
85 90 95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
100 105 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
115 120 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
130 135 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145 150 155 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
165 170 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
180 185 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
195 200 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
210 215 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225 230 235 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
245 250 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
260 265 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
275 280 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
290 295 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305 310 315 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Met Leu Ala Phe Val
325 330 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
340 345 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
355 360 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
370 375 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385 390 395 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
405 410 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
420 425 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
435 440 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
450 455 460
Phe Pro
465

583

<210> 55
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor V341F)

<400> 55
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
20 25 30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
35 40 45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
50 55 60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65 70 75 80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
85 90 95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
100 105 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
115 120 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
130 135 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145 150 155 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
165 170 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
180 185 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
195 200 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
210 215 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225 230 235 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
245 250 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
260 265 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
275 280 285

Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
290 295 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305 310 315 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
325 330 335
Arg Phe Ser Leu Phe Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
340 345 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
355 360 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
370 375 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385 390 395 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
405 410 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly

584

```
           420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
       435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
   450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 56
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor A352T)

<400> 56

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

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

585

```
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 57
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor A354V)

<400> 57

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30

Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
```

580

305 310 315 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
325 330 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
340 345 350
Thr Val Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
355 360 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
370 375 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385 390 395 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
405 410 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
420 425 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
435 440 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
450 455 460
Phe Pro
465

<210> 58
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor M358I)

<400> 58
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
20 25 30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
35 40 45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
50 55 60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65 70 75 80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
85 90 95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
100 105 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
115 120 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
130 135 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145 150 155 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
165 170 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
180 185 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
195 200 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
210 215 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225 230 235 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
245 250 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp

58A

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

<210> 59
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor M358V)

<400> 59

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
```

588

```
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240

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

<210> 60
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor P363R)

<400> 60

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

589

```
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Arg Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 61
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor R364Q)

<400> 61

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

590

000525

```
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Gln Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445

Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465


<210> 62
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor T367S)

<400> 62
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
```

591

```
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Ser Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 63
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor C370F)

<400> 63
```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
```

592

```
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Phe Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 64
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor C389G)

593

<400> 64

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

Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Gly Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

594

<210> 65
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor G391S)

<400> 65

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
```

595

```
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 66
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor G402E)

<400> 66

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300

Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
```

596

```
385                 390                 395                 400
Lys Glu Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 67
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor G402R)

<400> 67

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

Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
```

597

```
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Arg Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 68
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor D403H)

<400> 68

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45

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

598

000533

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

<210> 69
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor R413Q)

<400> 69

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
```

599

000534

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

<210> 70
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor T419M)

```
<400> 70
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
```

60

```
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Met Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 71
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor G435E)

<400> 71

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
```

601

000536

```
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Prb Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Glu Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 72
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor E445K)

```
<400> 72
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1                5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
```

602

000537

```
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Lys Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 73
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor R375W)

<400> 73

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
```

603

000538

```
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365

Asp Cys Leu Gln Gln Ser Trp Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 74
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante FVII (precursor R375K)

<400> 74
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln

604

```
 1               5                  10                  15
Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
            20                  25                  30
Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
        35                  40                  45
Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65                  70                  75                  80
Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
                85                  90                  95
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
        115                 120                 125
Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
    130                 135                 140
Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
            180                 185                 190
Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
    210                 215                 220
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
                245                 250                 255
Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
            260                 265                 270
Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
        275                 280                 285
Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala
    290                 295                 300
Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro
305                 310                 315                 320
Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val
                325                 330                 335
Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala
            340                 345                 350
Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln
        355                 360                 365
Asp Cys Leu Gln Gln Ser Lys Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr
    370                 375                 380
Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp
                405                 410                 415
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
            420                 425                 430
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln
        435                 440                 445
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 75
<211> 304
<212> PRT
<213> Homo sapiens

605

<220>
<223> Precursor de isoforma a TFPI

<400> 75
Met Ile Tyr Thr Met Lys Lys Val His Ala Leu Trp Ala Ser Val Cys
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asn Leu Ala Pro Ala Pro Leu Asn Ala Asp Ser Glu Glu
20 25 30
Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu Pro Pro Leu Lys
35 40 45
Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys
50 55 60
Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu
65 70 75 80
Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser
85 90 95
Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala Asn Arg Ile
100 105 110
Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu
115 120 125
Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn
130 135 140
Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly
145 150 155 160
Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu
165 170 175
Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly Thr Gln Leu Asn
180 185 190
Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val Pro Ser Leu
195 200 205
Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly
210 215 220
Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly
225 230 235 240
Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn
245 250 255
Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly Phe Ile
260 265 270
Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys
275 280 285
Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe Val Lys Asn Met
290 295 300

<210> 76
<211> 276
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> isoforma a TFPI madura

<400> 76
Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu
1 5 10 15
Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp
20 25 30
Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
35 40 45
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn
50 55 60
Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn
65 70 75 80
Ala Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe
85 90 95
Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg

bob

```
            100                 105                 110
Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly
        115                 120                 125
Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys
    130                 135                 140
Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly
145                 150                 155                 160
Thr Gln Leu Asn Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys
                165                 170                 175
Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
            180                 185                 190
Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn
        195                 200                 205
Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly
    210                 215                 220
Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys
225                 230                 235                 240
Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys
                245                 250                 255
Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe
            260                 265                 270
Val Lys Asn Met
        275
```

<210> 77
<211> 251
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> precursor de isoforma b TFPI

<400> 77

```
Met Ile Tyr Thr Met Lys Lys Val His Ala Leu Trp Ala Ser Val Cys
 1                5                  10                  15
Leu Leu Leu Asn Leu Ala Pro Ala Pro Leu Asn Ala Asp Ser Glu Glu
            20                  25                  30
Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu Pro Pro Leu Lys
        35                  40                  45
Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys
    50                  55                  60
Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu
65                  70                  75                  80
Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser
                85                  90                  95
Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala Asn Arg Ile
            100                 105                 110
Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu
        115                 120                 125
Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn
    130                 135                 140
Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly
145                 150                 155                 160
Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu
                165                 170                 175
Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly Thr Gln Leu Asn
            180                 185                 190
Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val Pro Ser Leu
        195                 200                 205
Phe Val Thr Lys Glu Gly Thr Asn Asp Gly Trp Lys Asn Ala Ala His
    210                 215                 220
Ile Tyr Gln Val Phe Leu Asn Ala Phe Cys Ile His Ala Ser Met Phe
225                 230                 235                 240
Phe Leu Gly Leu Asp Ser Ile Ser Cys Leu Cys
                245                 250
```

bon

<210> 78
<211> 222
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> isoforma b TFPI madura

<400> 78
Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu Pro
1 5 10 15
Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly
20 25 30
Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
35 40 45
Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg
50 55 60
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala
65 70 75 80
Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys
85 90 95
Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr
100 105 110
Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly
115 120 125
Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn
130 135 140
Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly Thr
145 150 155 160
Gln Leu Asn Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val
165 170 175
Pro Ser Leu Phe Val Thr Lys Glu Gly Thr Asn Asp Gly Trp Lys Asn
180 185 190
Ala Ala His Ile Tyr Gln Val Phe Leu Asn Ala Phe Cys Ile His Ala
195 200 205
Ser Met Phe Phe Leu Gly Leu Asp Ser Ile Ser Cys Leu Cys
210 215 220

<210> 79
<211> 213
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TFPI-2 maduro

<400> 79
Asp Ala Ala Gln Glu Pro Thr Gly Asn Asn Ala Glu Ile Cys Leu Leu
1 5 10 15
Pro Leu Asp Tyr Gly Pro Cys Arg Ala Leu Leu Leu Arg Tyr Tyr Tyr
20 25 30
Asp Arg Tyr Thr Gln Ser Cys Arg Gln Phe Leu Tyr Gly Gly Cys Glu
35 40 45
Gly Asn Ala Asn Asn Phe Tyr Thr Trp Glu Ala Cys Asp Asp Ala Cys
50 55 60
Trp Arg Ile Glu Lys Val Pro Lys Val Cys Arg Leu Gln Val Ser Val
65 70 75 80

Asp Asp Gln Cys Glu Gly Ser Thr Glu Lys Tyr Phe Phe Asn Leu Ser
85 90 95
Ser Met Thr Cys Glu Lys Phe Phe Ser Gly Gly Cys His Arg Asn Arg
100 105 110
Ile Glu Asn Arg Phe Pro Asp Glu Ala Thr Cys Met Gly Phe Cys Ala

608

```
        115                 120                 125
Pro Lys Lys Ile Pro Ser Phe Cys Tyr Ser Pro Lys Asp Glu Gly Leu
    130                 135                 140
Cys Ser Ala Asn Val Thr Arg Tyr Tyr Phe Asn Pro Arg Tyr Arg Thr
145                 150                 155                 160
Cys Asp Ala Phe Thr Tyr Thr Gly Cys Gly Gly Asn Asp Asn Asn Phe
                165                 170                 175
Val Ser Arg Glu Asp Cys Lys Arg Ala Cys Ala Lys Ala Leu Lys Lys
            180                 185                 190
Lys Lys Lys Met Pro Lys Leu Arg Phe Ala Ser Arg Ile Arg Lys Ile
        195                 200                 205
Arg Lys Lys Gln Phe
    210
```

<210> 80
<211> 245
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Quimotripsinógeno B maduro

<400> 80

```
Cys Gly Val Pro Ala Ile His Pro Val Leu Ser Gly Leu Ser Arg Ile
 1               5                  10                  15
Val Asn Gly Glu Asp Ala Val Pro Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser
            20                  25                  30
Leu Gln Asp Lys Thr Gly Phe His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser
        35                  40                  45
Glu Asp Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Gly Val Arg Thr Ser Asp
    50                  55                  60
Val Val Val Ala Gly Glu Phe Asp Gln Gly Ser Asp Glu Glu Asn Ile
65                  70                  75                  80
Gln Val Leu Lys Ile Ala Lys Val Phe Lys Asn Pro Lys Phe Ser Ile
                85                  90                  95
Leu Thr Val Asn Asn Asp Ile Thr Leu Leu Lys Leu Ala Thr Pro Ala
            100                 105                 110
Arg Phe Ser Gln Thr Val Ser Ala Val Cys Leu Pro Ser Ala Asp Asp
        115                 120                 125
Asp Phe Pro Ala Gly Thr Leu Cys Ala Thr Thr Gly Trp Gly Lys Thr
    130                 135                 140
Lys Tyr Asn Ala Asn Lys Thr Pro Asp Lys Leu Gln Gln Ala Ala Leu
145                 150                 155                 160
Pro Leu Leu Ser Asn Ala Glu Cys Lys Lys Ser Trp Gly Arg Arg Ile
                165                 170                 175
Thr Asp Val Met Ile Cys Ala Gly Ala Ser Gly Val Ser Ser Cys Met
            180                 185                 190
Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gln Lys Asp Gly Ala Trp Thr
        195                 200                 205
Leu Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Asp Thr Cys Ser Thr Ser Ser
    210                 215                 220
Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Thr Lys Leu Ile Pro Trp Val Gln Lys
225                 230                 235                 240
Ile Leu Ala Ala Asn
                245
```

<210> 81
<211> 3141
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante 1 del transcripto FVII

000544

<400> 81
agtcccatgg ggaatgtcaa caggcagggg cagcactgca gagatttcat catggtctcc 60
caggccctca ggctcctctg ccttctgctt gggcttcagg gctgcctggc tgcaggcggg 120
gtcgctaagg cctcaggagg agaaacacgg gacatgccgt ggaagccggg gcctcacaga 180
gtcttcgtaa cccaggagga agcccacggc gtcctgcacc ggcgccggcg cgccaacgcg 240
ttcctggagg agctgcggcc gggctccctg gagagggagt gcaaggagga gcagtgctcc 300
ttcgaggagg cccgggagat cttcaaggac gcggagagga cgaagctgtt ctggatttct 360
tacagtgatg gggaccagtg tgcctcaagt ccatgccaga atgggggctc ctgcaaggac 420
cagctccagt cctatatctg cttctgcctc cctgccttcg agggccggaa ctgtgagacg 480
cacaaggatg accagctgat ctgtgtgaac gagaacggcg gctgtgagca gtactgcagt 540
gaccacacgg gcaccaagcg ctcctgtcgg tgccacgagg ggtactctct gctggcagac 600
ggggtgtcct gcacacccac agttgaatat ccatgtggaa aaatacctat tctagaaaaa 660
agaaatgcca gcaaacccca aggccgaatt gtgggggggca aggtgtgccc caaaggggag 720
tgtccatggc aggtcctgtt gttggtgaat ggagctcagt tgtgtggggg gaccctgatc 780
aacaccatct gggtggtctc cgcggcccac tgtttcgaca aaatcaagaa ctggaggaac 840
ctgatcgcgg tgctgggcga gcacgacctc agcgagcacg acggggatga gcagagccgg 900
cgggtggcgc aggtcatcat ccccagcacg tacgtcccgg gcaccaccaa ccacgacatc 960
gcgctgctcc gcctgcacca gcccgtggtc ctcactgacc atgtggtgcc cctctgcctg 1020
cccgaacgga cgttctctga gaggacgctg gccttcgtgc gcttctcatt ggtcagcggc 1080
tggggccagc tgctggaccg tggcgccacg gccctggagc tcatggtcct caacgtgccc 1140
cggctgatga cccaggactg cctgcagcag tcacggaagg tgggagactc cccaaatatc 1200
acggagtaca tgttctgtgc cggctactcg gatggcagca aggactcctg caaggggac 1260
agtggaggcc cacatgccac ccactaccgg ggcacgtggt acctgacggg catcgtcagc 1320
tggggccagg gctgcgcaac cgtgggccac tttggggtgt acaccagggt ctcccagtac 1380
atcgagtggc tgcaaaagct catgcgctca gagccacgcc caggagtcct cctgcgagcc 1440
ccatttccct agcccagcag ccctggcctg tggagagaaa gccaaggctg cgtcgaactg 1500
tcctggcacc aaatcccata tattcttctg cagttaatgg ggtagaggag ggcatgggag 1560
ggagggagag gtggggaggg agacagagac agaaacagag agagacagag acagagagag 1620
actgagggag agactctgag gacatggaga gagactcaaa gagactccaa gattcaaaga 1680
gactaataga gacacagaga tggaatagaa aagatgagag gcagaggcag acaggcgctg 1740
gacagagggg caggggagtg ccaaggttgt cctggaggca gacagcccag ctgagcctcc 1800
ttacctccct tcagccaagc ccacctgcac gtgatctgct ggcctcaggc tgctgctctg 1860
ccttcattgc tggagacagt agaggcatga acacacatgg atgcacacac acacacgcca 1920
atgcacacac acagagatat gcacacacac ggatgcacac acagatggtc acacagagat 1980
acgcaaacac accgatgcac acgcacatag agatatgcac acacagatgc acacacagat 2040
atacacatgg atgcacgcac atgccaatgc acgcacacat cagtgcacac ggatgcacag 2100
agatatgcac acaccgatgt gcgcacacac agatatgcac acacatggat gagcacacac 2160
acaccaatgc gcacacacac cgatgtacac acacagatgc acacacagat gcacacacac 2220
cgatgctgac tccatgtgtg ctgtcctctg aaggcggttg tttagctctc acttttctgg 2280
ttcttatcca ttatcatctt cacttcagac aattcagaag catcaccatg catggtggcg 2340
aatgccccca aactctcccc caaatgtatt tctcccttcg ctgggtgccg ggctgcacag 2400
actattcccc acctgcttcc cagcttcaca ataaacggct gcgtctcctc cgcacacctg 2460
tggtgcctgc cacccactgg gttgcccatg attcattttt ggagcccccg gtgctcatcc 2520
tctgagatgc tcttttcttt cacaatttcc aacatcactg aaatgaaccc tcacatggaa 2580
gctatttttt aaaaacaaaa gctgtttgat agatgtttga ggctgtagct cccaggatcc 2640
tgtggaattg gatgttctct ccctgccaca gcccttgtca atgatatttc acagagaccc 2700
tgggagcacc tgctcaagag tcagggacac acgcatcact aaatgcaagt tcccaggccc 2760
tggctgcagt gggaggacct ggcaagctgc actcttgctg agtccccagg gtggtggaag 2820
aagaatgaga aacacatgaa cagagaaatg gggaggtgac aaacagtgcc cccactcaga 2880
ctccggcaag cacggctcag agagtggact cgatgccatc cctgcagggc cgtcctgggc 2940
accactggca ctcacagcag caaggtgggc accattggca ctcacagcag caaggcaggc 3000
accagcaacc cacctcgggg gcactcaggc atcatctact tcagagcaga cagggtctat 3060
gaactacagc cgtgggctgc ttccaaggca ccctgctctt gtaaataaag ttttatggga 3120
acacaaaaaa aaaaaaaaaa a 3141

<210> 82
<211> 3075
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> variante 2 del transcripto FVII

<400> 82
agtcccatgg ggaatgtcaa caggcagggg cagcactgca gagatttcat catggtctcc 60
caggccctca ggctcctctg ccttctgctt gggcttcagg gctgcctggc tgcagtcttc 120

610

000545

gtaacccagg aggaagccca cggcgtcctg caccggcgcc ggcgcgccaa cgcgttcctg 180
gaggagctgc ggccgggctc cctggagagg gagtgcaagg aggagcagtg ctccttcgag 240
gaggcccggg agatcttcaa ggacgcggag aggacgaagc tgttctggat ttcttacagt 300
gatggggacc agtgtgcctc aagtccatgc cagaatgggg gctcctgcaa ggaccagctc 360
cagtcctata tctgcttctg cctccctgcc ttcgagggcc ggaactgtga gacgcacaag 420
gatgaccagc tgatctgtgt gaacgagaac ggcggctgtg agcagtactg cagtgaccac 480
acgggcacca agcgctcctg tcggtgccac gaggggtact ctctgctggc agacggggtg 540
tcctgcacac ccacagttga atatccatgt ggaaaaatac ctattctaga aaaaagaaat 600
gccagcaaac cccaaggccg aattgtgggg ggcaaggtgt gccccaaagg ggagtgtcca 660
tggcaggtcc tgttgttggt gaatggagct cagttgtgtg gggggaccct gatcaacacc 720
atctgggtgg tctccgcggc ccactgtttc gacaaaatca agaactggag gaacctgatc 780
gcggtgctgg gcgagcacga cctcagcgag cacgacgggg atgagcagag ccggcgggtg 840
gcgcaggtca tcatccccag cacgtacgtc ccgggcacca ccaaccacga catcgcgctg 900
ctccgcctgc accagcccgt ggtcctcact gaccatgtgg tgcccctctg cctgcccgaa 960
cggacgttct ctgagaggac gctggccttc gtgcgcttct cattggtcag cggctggggc 1020
cagctgctgg accgtggcgc cacggccctg gagctcatgg tcctcaacgt gccccggctg 1080
atgacccagg actgcctgca gcagtcacgg aaggtgggag actccccaaa tatcacggag 1140
tacatgttct gtgccggcta ctcggatggc agcaaggact cctgcaaggg ggacagtgga 1200
ggcccacatg ccacccacta ccggggcacg tggtacctga cgggcatcgt cagctggggc 1260
cagggctgcg caaccgtggg ccactttggg gtgtacacca gggtctccca gtacatcgag 1320
tggctgcaaa agctcatgcg ctcagagcca cgcccaggag tcctcctgcg agccccattt 1380
cctagccca gcagccctgg cctgtggaga gaaagccaag gctgcgtcga actgtcctgg 1440
caccaaatcc catatattct tctgcagtta atggggtaga ggagggcatg ggagggaggg 1500
agaggtgggg agggagacag agacagaaac agagagagac agagacagag agagactgag 1560
ggagagactc tgaggacatg gagagagact caaagagact ccaagattca aagagactaa 1620
tagagacaca gagatggaat agaaaagatg agaggcagag gcagacaggc gctggacaga 1680
ggggcagggg agtgccaagg ttgtcctgga ggcagacagc ccagctgagc ctccttacct 1740
cccttcagcc aagcccacct gcacgtgatc tgctggcctc aggctgctgc tctgccttca 1800
ttgctggaga cagtagaggc atgaacacac atggatgcac acacacacac gccaatgcac 1860
acacacagag atatgcacac acacggatgc acacacagat ggtcacacag agatacgcaa 1920
acacaccgat gcacacgcac atagagatat gcacacacag atgcacacac agatatacac 1980
atggatgcac gcacatgcca atgcacgcac acatcagtgc acacggatgc acagagatat 2040
gcacacaccg atgtgcgcac acacagatat gcacacacat ggatgagcac acacacacca 2100
atgcgcacac acaccgatgt acacacacag atgcacacac agatgcacac acaccgatgc 2160
tgactccatg tgtgctgtcc tctgaaggcg gttgtttagc tctcactttt ctggttctta 2220
tccattatca tcttcacttc agacaattca gaagcatcac catgcatggt ggcgaatgcc 2280
cccaaactct cccccaaatg tatttctccc ttcgctgggt gccgggctgc acagactatt 2340
cccaacctgc ttcccagctt cacaataaac ggctgcgtct cctccgcaca cctgtggtgc 2400
ctgccaccca ctgggttgcc catgattcat ttttggagcc cccggtgctc atcctctgag 2460
atgctctttt ctttcacaat tttcaacatc actgaaatga accctcacat ggaagctatt 2520
ttttaaaaac aaaagctgtt tgatagatgt ttgaggctgt agctcccagg atcctgtgga 2580
attggatgtt ctctccctgc cacagccctt gtcaatgata tttcacagag accctgggag 2640
cacctgctca agagtcaggg acacacgcat cactaaatgc aagttcccag gccctggctg 2700
cagtgggagg acctggcaag ctgcactctt gctgagtccc cagggtggtg gaagaagaat 2760
gagaaacaca tgaacagaga aatggggagg tgacaaacag tgcccccact cagactccgg 2820
caagcacggc tcagagagtg gactcgatgc catcctgca gggccgtcct gggcaccact 2880
ggcactcaca gcagcaaggt gggcaccatt ggcactcaca gcagcaaggc aggcaccagc 2940
aaccdacctc gggggcactc aggcatcatc tacttcagag cagacagggt ctatgaacta 3000
cagcdgtggg ctgcttccaa ggcaccctgc tcttgtaaat aaagttttat gggaacacaa 3060
aaaaaaaaaa aaaaa 3075

<210> 83
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> dominio Gla del factor IX

<400> 83
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val

611

000546

35 40 45

<210> 84
<211> 45
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> dominio Gla del factor X

<400> 84
Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
20 25 30
Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys
35 40 45

<210> 85
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> dominio Gla protrombina/trombina

<400> 85
Ala Asn Thr Phe Leu Glu Glu Val Arg Lys Gly Asn Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Val Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe Glu Ala Leu Glu
20 25 30
Ser Ser Thr Ala Thr Asp Val Phe Trp Ala Lys Tyr Thr Ala
35 40 45

<210> 86
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> dominio Gla de proteína C

<400> 86
Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg His Ser Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Ile Glu Glu Ile Cys Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Gln
20 25 30
Asn Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His Val Asp
35 40 45

<210> 87
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> dominio Gla de proteína S

6/12

000547

<400> 87
Ala Asn Ser Leu Leu Glu Glu Thr Lys Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Ile Glu Glu Leu Cys Asn Lys Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
20 25 30
Asn Asp Pro Glu Thr Asp Tyr Phe Tyr Pro Lys Tyr Leu Val
35 40 45

<210> 88
<211> 47
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> dominio Gla de osteocalcina (proteína Gla del hueso)

<400> 88
Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu
1 5 10 15
Glu Pro Arg Arg Glu Val Cys Glu Leu Asn Pro Asp Cys Asp Glu Leu
20 25 30
Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly
35 40 45

<210> 89
<211> 47
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> dominio Gla de proteína Gla matriz

<400> 89
Arg Ala Lys Val Gln Glu Arg Ile Arg Glu Arg Ser Lys Pro Val His
1 5 10 15
Glu Leu Asn Arg Glu Ala Cys Asp Asp Tyr Arg Leu Cys Glu Arg Tyr
20 25 30
Ala Met Val Tyr Gly Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Arg Tyr Phe Arg
35 40 45

<210> 90
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> dominio Gla de proteína 6 especifica que detiene el crecimiento

<400> 90
Phe Glu Glu Ala Lys Gln Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu
1 5 10 15
Leu Cys Ser Arg Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Asp Pro Glu
20 25 30
Thr Asp Tyr Phe Tyr Pro Arg Tyr Leu Asp
35 40

<210> 91
<211> 46
<212> PRT

b13

<213> Homo sapiens

<220>
<223> dominio Gla de proteína Z

<400> 91
Ala Gly Ser Tyr Leu Leu Glu Glu Leu Phe Glu Gly Asn Leu Glu Lys
1 5 10 15
Glu Cys Tyr Glu Glu Ile Cys Val Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Glu Val Val Thr Asp Glu Phe Trp Arg Arg Tyr Lys
35 40 45

<210> 92
<211> 45
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> dominio Gla de factor VII

<400> 92
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser
35 40 45

<210> 93
<211> 40
<212> PRT
<213> Notechis scutatus scutatus

<220>
<223> proteasa tipo Xa del factor de coagulación de veneno - dominio Gla

<220>
<221> INSEGURO
<222> 38, 39
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 93
Ser Asn Ser Leu Phe Glu Glu Ile Arg Pro Gly Asn Ile Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Ile Glu Glu Lys Cys Ser Lys Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
20 25 30
Asp Asn Glu Lys Thr Xaa Xaa Phe
35 40

<210> 94
<211> 46
<212> PRT
<213> Tropidechis carinatus

<220>
<223> Proteasa tipo Xa del factor de coagulación de veneno - dominio Gla

604

<400> 94
Ser Asn Ser Leu Phe Glu Glu Ile Arg Pro Gly Asn Ile Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Ile Glu Glu Lys Cys Ser Lys Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
20 25 30
Asp Asn Glu Lys Thr Glu Thr Phe Trp Asn Val Tyr Val Asp
35 40 45

<210> 95
<211> 464
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> precursor de antitrombina III

<400> 95
Met Tyr Ser Asn Val Ile Gly Thr Val Thr Ser Gly Lys Arg Lys Val
1 5 10 15
Tyr Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ile Gly Phe Trp Asp Cys Val Thr Cys
20 25 30
His Gly Ser Pro Val Asp Ile Cys Thr Ala Lys Pro Arg Asp Ile Pro
35 40 45
Met Asn Pro Met Cys Ile Tyr Arg Ser Pro Glu Lys Lys Ala Thr Glu
50 55 60
Asp Glu Gly Ser Glu Gln Lys Ile Pro Glu Ala Thr Asn Arg Arg Val
65 70 75 80
Trp Glu Leu Ser Lys Ala Asn Ser Arg Phe Ala Thr Thr Phe Tyr Gln
85 90 95
His Leu Ala Asp Ser Lys Asn Asp Asn Asp Asn Ile Phe Leu Ser Pro
100 105 110
Leu Ser Ile Ser Thr Ala Phe Ala Met Thr Lys Leu Gly Ala Cys Asn
115 120 125
Asp Thr Leu Gln Gln Leu Met Glu Val Phe Lys Phe Asp Thr Ile Ser
130 135 140
Glu Lys Thr Ser Asp Gln Ile His Phe Phe Phe Ala Lys Leu Asn Cys
145 150 155 160
Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Asn Lys Ser Ser Lys Leu Val Ser Ala Asn
165 170 175
Arg Leu Phe Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Asn Glu Thr Tyr Gln Asp
180 185 190
Ile Ser Glu Leu Val Tyr Gly Ala Lys Leu Gln Pro Leu Asp Phe Lys
195 200 205
Glu Asn Ala Glu Gln Ser Arg Ala Ala Ile Asn Lys Trp Val Ser Asn
210 215 220
Lys Thr Glu Gly Arg Ile Thr Asp Val Ile Pro Ser Glu Ala Ile Asn
225 230 235 240
Glu Leu Thr Val Leu Val Leu Val Asn Thr Ile Tyr Phe Lys Gly Leu
245 250 255
Trp Lys Ser Lys Phe Ser Pro Glu Asn Thr Arg Lys Glu Leu Phe Tyr
260 265 270
Lys Ala Asp Gly Glu Ser Cys Ser Ala Ser Met Met Tyr Gln Glu Gly
275 280 285

Lys Phe Arg Tyr Arg Arg Val Ala Glu Gly Thr Gln Val Leu Glu Leu
290 295 300
Pro Phe Lys Gly Asp Asp Ile Thr Met Val Leu Ile Leu Pro Lys Pro
305 310 315 320
Glu Lys Ser Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Leu Thr Pro Glu Val Leu
325 330 335
Gln Glu Trp Leu Asp Glu Leu Glu Glu Met Met Leu Val Val His Met
340 345 350
Pro Arg Phe Arg Ile Glu Asp Gly Phe Ser Leu Lys Glu Gln Leu Gln
355 360 365
Asp Met Gly Leu Val Asp Leu Phe Ser Pro Glu Lys Ser Lys Leu Pro

615

006550

```
    370                 375                 380
Gly Ile Val Ala Glu Gly Arg Asp Asp Leu Tyr Val Ser Asp Ala Phe
385                 390                 395                 400
His Lys Ala Phe Leu Glu Val Asn Glu Glu Gly Ser Glu Ala Ala Ala
                405                 410                 415
Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg Ser Leu Asn Pro Asn Arg Val
            420                 425                 430
Thr Phe Lys Ala Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile Arg Glu Val Pro
        435                 440                 445
Leu Asn Thr Ile Ile Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro Cys Val Lys
    450                 455                 460
```

<210> 96
<211> 432
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Antitrombina III madura

<400> 96

```
His Gly Ser Pro Val Asp Ile Cys Thr Ala Lys Pro Arg Asp Ile Pro
 1                5                  10                  15
Met Asn Pro Met Cys Ile Tyr Arg Ser Pro Glu Lys Lys Ala Thr Glu
            20                  25                  30
Asp Glu Gly Ser Glu Gln Lys Ile Pro Glu Ala Thr Asn Arg Arg Val
        35                  40                  45
Trp Glu Leu Ser Lys Ala Asn Ser Arg Phe Ala Thr Thr Phe Tyr Gln
    50                  55                  60
His Leu Ala Asp Ser Lys Asn Asp Asn Asp Asn Ile Phe Leu Ser Pro
65                  70                  75                  80
Leu Ser Ile Ser Thr Ala Phe Ala Met Thr Lys Leu Gly Ala Cys Asn
                85                  90                  95
Asp Thr Leu Gln Gln Leu Met Glu Val Phe Lys Phe Asp Thr Ile Ser
            100                 105                 110
Glu Lys Thr Ser Asp Gln Ile His Phe Phe Phe Ala Lys Leu Asn Cys
        115                 120                 125
Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Asn Lys Ser Ser Lys Leu Val Ser Ala Asn
    130                 135                 140
Arg Leu Phe Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Asn Glu Thr Tyr Gln Asp
145                 150                 155                 160
Ile Ser Glu Leu Val Tyr Gly Ala Lys Leu Gln Pro Leu Asp Phe Lys
                165                 170                 175
Glu Asn Ala Glu Gln Ser Arg Ala Ala Ile Asn Lys Trp Val Ser Asn
            180                 185                 190
Lys Thr Glu Gly Arg Ile Thr Asp Val Ile Pro Ser Glu Ala Ile Asn
        195                 200                 205
Glu Leu Thr Val Leu Val Leu Val Asn Thr Ile Tyr Phe Lys Gly Leu
    210                 215                 220
Trp Lys Ser Lys Phe Ser Pro Glu Asn Thr Arg Lys Glu Leu Phe Tyr
225                 230                 235                 240
Lys Ala Asp Gly Glu Ser Cys Ser Ala Ser Met Met Tyr Gln Glu Gly
                245                 250                 255
Lys Phe Arg Tyr Arg Arg Val Ala Glu Gly Thr Gln Val Leu Glu Leu
            260                 265                 270
Pro Phe Lys Gly Asp Asp Ile Thr Met Val Leu Ile Leu Pro Lys Pro
        275                 280                 285
Glu Lys Ser Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Leu Thr Pro Glu Val Leu
    290                 295                 300
Gln Glu Trp Leu Asp Glu Leu Glu Glu Met Met Leu Val Val His Met
305                 310                 315                 320
Pro Arg Phe Arg Ile Glu Asp Gly Phe Ser Leu Lys Glu Gln Leu Gln
                325                 330                 335
Asp Met Gly Leu Val Asp Leu Phe Ser Pro Glu Lys Ser Lys Leu Pro
            340                 345                 350
```

```
Gly Ile Val Ala Glu Gly Arg Asp Asp Leu Tyr Val Ser Asp Ala Phe
        355                 360                 365
His Lys Ala Phe Leu Glu Val Asn Glu Glu Gly Ser Glu Ala Ala Ala
    370                 375                 380
Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg Ser Leu Asn Pro Asn Arg Val
385                 390                 395                 400
Thr Phe Lys Ala Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile Arg Glu Val Pro
                405                 410                 415
Leu Asn Thr Ile Ile Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro Cys Val Lys
            420                 425                 430
```

<210> 97
<211> 263
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Factor de tejido maduro

<400> 97

```
Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
 1               5                  10                  15
Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
            20                  25                  30
Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
        35                  40                  45
Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
    50                  55                  60
Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
65                  70                  75                  80
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
                85                  90                  95
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
            100                 105                 110
Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
        115                 120                 125
Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
    130                 135                 140
Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
145                 150                 155                 160
Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
                165                 170                 175
Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
            180                 185                 190
Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
        195                 200                 205
Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile
    210                 215                 220
Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile
225                 230                 235                 240
Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu
                245                 250                 255
Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser
            260
```

<210> 98
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> variante del factor VIIa V21D/E154V/M156Q

<400> 98

617

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 99
<211> 4278
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> vector de escritura pCMV

<400> 99
atgcattagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga 60
gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca acgacccccg 120
cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg 180

618

```
acgttaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca 240
tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct ggcattatgc 300
ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc 360
tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc 420
acgggatttc ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcaccaaaa 480
tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgccccа ttgacgcaaa tgggcggtag 540
gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctggttta gtgaaccgtc agatccgcta 600
gcgattacgc caagctcgaa attaaccctc actaaaggga acaaaagctg gagctccacc 660
gcggtggcgg ccgctctagc ccgggcggat ccccgggct gcaggaattc gatatcaagc 720
ttatcgatac cgtcgacctc gaggggggge ccggtaccag gtaagtgtac ccaattcgcc 780
ctatagtgag tcgtattaca attcactcga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa 840
tggcgaatgg agatccaatt tttaagtgta taatgtgtta aactactgat tctaattgtt 900
tgtgtatttt agattccaca tcccaaggct catttcaggc ccctcagtcc tcacagtctg 960
ttcattgatca taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt aaaaaacctc 1020
ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt taacttgttt 1080
attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca 1140
ttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttaacgcgta 1200
aattgtaagc gttaatattt tgttaaaatt cgcgttaaat ttttgttaaa tcagctcatt 1260
ttttaaccaa taggccgaaa tcggcaaaat cccttataaa tcaaaagaat agaccgagat 1320
agggttgagt gttgttccag tttggaacaa gagtccacta ttaaagaacg tggactccaa 1380
cgtcaaaggg cgaaaaaccg tctatcaggg cgatggccca ctacgtgaac catcacccta 1440
atcaagtttt ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat cggaacccta aagggagccc 1500
ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag ggaagaaagc 1560
gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc acgctgcgcg taaccaccac 1620
acccgccgcg cttaatgcgc cgctacaggg cgcgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt 1680
gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag 1740
acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagaatcctg aggcggaaag 1800
aaccagctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc 1860
agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc 1920
tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg 1980
cccctaactc cgcccatccc gcccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat 2040
ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc 2100
cagaagtagt gaggaggctt ttttggaggc ctaggctttt gcaaagatcg atcaagagac 2160
aggatgagga tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc 2220
ttgggtggag aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc 2280
cgccgtgttc cggctgtcag cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc 2340
cggtgccctg aatgaactgc aagacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg 2400
cgttcctigc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt 2460
gggcgaagtg ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc 2520
catcatggct gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gcccattcga 2580
ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgtcga 2640
tcaggatgat ctggacgaag aacatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct 2700
caaggcgagc atgcccgacg gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc 2760
gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt 2820
ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc tacccgtgat attgctgaag aacttggcgg 2880
cgaatgggct gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcat 2940
cgccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctggggtt cgaaatgacc 3000
gaccaagcga cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc cttctatgaa 3060
aggttgggct tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatcctcca gcgcggggat 3120
ctcatgctgg agttcttcgc ccaccctagg gggaggctaa ctgaaacacg gaaggagaca 3180
ataccggaag gaacccgcgc tatgacggca ataaaaagac agaataaaac gcacggtgtt 3240
gggtcgtttg ttcataaacg cggggttcgg tcccagggct ggcactctgt cgataccccа 3300
ccgagacccc attgggggcca atacgcccgc gtttcttcct tttccccacc ccaccccccа 3360
agttcgggtg aaggcccagg gctcgcagcc aacgtcgggg cggcaggccc tgccatagcc 3420
tcaggttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc 3480
taggtgaaga tccttttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 3540
cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg 3600
cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg 3660
gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 3720
aatactgtcc ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 3780
cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 3840
tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 3900
acgggggttc cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 3960
ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat 4020
ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 4080
tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 4140
```


000554

tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc 4200
ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 4260
gataaccgta ttaccgcc 4278

<210> 100
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador PCR Delantero del Factor VII CBO-125

<400> 100
gcatcatgac gtgacggatc cgccaccatg gtctcccagg ccctc 45

<210> 101
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador PCR Inverso del Factor VII CBO-126

<400> 101
gatcgtacga tacgtgaatt cctagggaaa tggggctcgc aggag 45

<210> 102
<211> 1398
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> FVII cADN (plantilla para PCR)

<400> 102
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60
gcaggcgggg tcgctaaggc ctcaggagga gaaacacggg acatgccgtg gaagccgggg 120
cctcacagag tcttcgtaac ccaggaggaa gcccacggcg tcctgcaccg gcgccggcgc 180
gccaacgcgt tcctggagga gctgcggccg ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 240
cagtgctcct tcgaggaggc ccgggagatc ttcaaggacg cggagaggac gaagctgttc 300
tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tggggctcc 360
tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac 420
tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 480
tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggt gccacgaggg gtactctctg 540
ctggcagacg gggtgtcctg cacacccaca gttgaatatc catgtggaaa aatacctatt 600
ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tgggggcaa ggtgtgcccc 660
aaagggcagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 720
accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 780
tggaggaacc tgatcgcggt gctgggcgag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag 840
cagagccggc gggtggcgca ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 900
cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcactgacca tgtggtgccc 960
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg 1020
gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 1080
aacgtgcccd ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 1140
ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1200
aaggggggca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1260
atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttggggtgta caccagggtc 1320
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc 1380
ctgcgagccc catttccc 1398

<210> 103
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

620

000555

<223> secuencia enlazada a albúmina de suero

<400> 103
Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1   5   10   15
Glu Asp Asp Phe
            20

<210> 104
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia enlazada a albúmina de suero

<400> 104
Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
 1   5   10

<210> 105
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia enlazada a albúmina de suero

<400> 105
Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp
 1   5   10

<210> 106
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia enlazada a albúmina de suero

<400> 106
Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1   5   10

<210> 107
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia enlazada a albúmina de suero

<400> 107
Gly Gly Gly Ser Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
 1   5   10   15
Trp

<210> 108
<211> 13

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia enlazada a albúmina de suero

<400> 108
Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp
 1   5   10

<210> 109
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia enlazada a albúmina de suero

<400> 109
Gly Gly Gly Ser Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
 1   5   10   15
Asp

<210> 110
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia enlazada a integrina IIb-IIIa de plaqueta

<400> 110
Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val
 1   5   10

<210> 111
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia enlazada a integrina IIb-IIIa de plaqueta

<400> 111

Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val Cys
 1   5   10

<210> 112
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia enlazada a integrina IIb-IIIa de plaqueta

<400> 112
Gly Gly Gly Ser Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val Cys
 1   5   10   15

<210> 113
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286N

<400> 113
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240

His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Asn Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 114
<211> 406

b23

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286E

<400> 114
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Glu Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 115
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

621

000559

<220>
<223> Q286D

<400> 115
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Asp Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 116
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286S

625

000560

<400> 116
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Ser Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 117
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286T

<400> 117
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

000561

```
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 118
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R

<400> 118

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
```

612

000562

```
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 119
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286K

```
<400> 119
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
```

628

000563

```
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Lys Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405


<210> 120
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286A

<400> 120
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
```

625

000564

```
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Ala Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 121
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286V

<400> 121

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


000565

```
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Val Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 122
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286M

<400> 122

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
```

631

000566

```
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Met Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 123
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q296L

<400> 123

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

632

000567

```
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Leu Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 124
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286Y

<400> 124

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

633

000568

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

<210> 125
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286G

<400> 125

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

000569

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

<210> 126
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286F

<400> 126

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
```

635

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

<210> 127
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286I

<400> 127
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp

676

```
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Ile Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 128
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286P

<400> 128

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
```

63

000572

```
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Pro Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 129
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286H

<400> 129

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly His Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
```

638

000573

290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 130
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286W

<400> 130
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Trp Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser

639

000574

305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 131
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/Gla intercambio FIX

<400> 131
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
35 40 45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65 70 75 80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
85 90 95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
100 105 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
115 120 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130 135 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145 150 155 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
165 170 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180 185 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195 200 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
210 215 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225 230 235 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245 250 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260 265 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
275 280 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
290 295 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305 310 315 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325 330 335

000575

```
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 132
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/H257A

<400> 132

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205

Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
```

000576

```
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 133
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/S222A

<400> 133

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

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

642

000577

```
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 134
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/S222A/H257A

<400> 134

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
```

370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 135
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/S222A/Gla intercambio FIX

<400> 135
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
35 40 45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65 70 75 80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
85 90 95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
100 105 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
115 120 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130 135 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145 150 155 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
165 170 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180 185 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195 200 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
210 215 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225 230 235 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245 250 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260 265 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
275 280 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
290 295 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305 310 315 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325 330 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340 345 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
355 360 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370 375 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385 390 395 400

006579

Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 136
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/H257A/Gla intercambio FIX

<400> 136
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
35 40 45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65 70 75 80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
85 90 95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
100 105 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
115 120 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130 135 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145 150 155 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
165 170 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180 185 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195 200 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
210 215 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225 230 235 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245 250 255
Asp Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260 265 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
275 280 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
290 295 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305 310 315 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325 330 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340 345 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
355 360 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370 375 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385 390 395 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

645

<210> 137
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/S222A/H257A/Gla intercambio FIX

<400> 137
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
35 40 45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65 70 75 80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
85 90 95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
100 105 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
115 120 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130 135 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145 150 155 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
165 170 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180 185 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195 200 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
210 215 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225 230 235 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245 250 255
Asp Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260 265 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
275 280 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
290 295 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305 310 315 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325 330 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340 345 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
355 360 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370 375 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385 390 395 400

Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 138

<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/M298Q

<400> 138
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335

Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 139
<211> 406

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/M298Q/K341Q

<400> 139
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100   105   110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115   120   125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130   135   140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145   150   155   160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165   170   175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180   185   190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195   200   205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210   215   220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225   230   235   240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245   250   255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260   265   270

Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275   280   285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290   295   300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305   310   315   320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325   330   335
Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340   345   350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355   360   365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370   375   380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385   390   395   400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405

<210> 140
<211> 406
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/M298Q/K199E

<400> 140
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Glu Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 141
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Q286R/M298Q/Gla intercambio FIX

<400> 141
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1   5   10   15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20   25   30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
        35   40   45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50   55   60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65   70   75   80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85   90   95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100   105   110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115   120   125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130   135   140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145   150   155   160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165   170   175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180   185   190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195   200   205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
    210   215   220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225   230   235   240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245   250   255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260   265   270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
        275   280   285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
    290   295   300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305   310   315   320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325   330   335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340   345   350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355   360   365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370   375   380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385   390   395   400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405

<210> 142
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/Q366V

<400> 142

000585

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 143
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/A292N/A294S/Q366V

<400> 143

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


000586

```
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Asn Thr Ser Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 144
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A175S/Q286R/Q366V

<400> 144

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

652

000587

```
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 145
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/Q286R/Q366V

<400> 145

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
```

65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 146
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H257S/Q286R

<400> 146
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95

65

000599

```
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ser Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405


<210> 147
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H257S/Q286R/Q366V


<400> 147
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
```

655

```
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ser Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 148
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/H257A/Q286R/Q366V

```
<400> 148
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
```

656

```
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 149
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/H373A

<400> 149

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

65

```
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Ala Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 150
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/H257A/Q286R/M158Q

<400> 150

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

68

```
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 151
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/K341D

<400> 151

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

Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
```

65

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

<210> 152
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/Q366D

<400> 152

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

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
```

660

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

<210> 153
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/Q366N

<400> 153

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

661

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

<210> 154
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/M298Q/Q366D

<400> 154

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
```

862

```
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 155
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/M298Q/Q366N

<400> 155

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
```

663

000598

```
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405


<210> 156
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/H373F


<400> 156
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
```


000599

225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255

His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 157
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q286R/M298Q/H373F

<400> 157
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190

His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn

665

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

<210> 158
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V158D/E296V/M298Q

<400> 158
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240

866

```
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 159
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239S

```
<400> 159
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ser Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
```

```
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 160
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239N

```
<400> 160
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Asn Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
```

668

```
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 161
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239Q

```
<400> 161
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Gln Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
```

```
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 162
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239V

<400> 162

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
```

620

000605

```
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 163
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239L

<400> 163

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Leu Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
```

000606

```
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 164
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239H

<400> 164

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr His Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
```

672

```
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 165
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239I

<400> 165

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
```

603

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 166
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> P321K

<400> 166
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Lys Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 167
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> P321E

<400> 167
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100   105   110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115   120   125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130   135   140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145   150   155   160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165   170   175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180   185   190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195   200   205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210   215   220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225   230   235   240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245   250   255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260   265   270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275   280   285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290   295   300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305   310   315   320
Glu Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325   330   335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340   345   350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355   360   365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370   375   380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385   390   395   400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405

<210> 168
<211> 406

0006810

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> P321Y

<400> 168
```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Tyr Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 169
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

676

<220>
<223> P321S

<400> 169
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Ser Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 170
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q366D

<400> 170
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 171
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q366E

<400> 171
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

628

```
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 172
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q366N

<400> 172
```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
```

```
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 173
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q366T

<400> 173

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

```
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 174
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q366S

```
<400> 174
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
```

```
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 175
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q366V

<400> 175

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

652

```
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 176
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q366I

<400> 176

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
```

683

```
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 177
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q366L

<400> 177

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

0006'0

```
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Leu Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 178
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q366M

<400> 178

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

685

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

<210> 179
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H373D

```
<400> 179
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
```


006621

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

<210> 180
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H373E

<400> 180

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
```

687

000522

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

<210> 181
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H373S

<400> 181
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp

688

```
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365

Ala Thr Val Gly Ser Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 182
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H373F

<400> 182

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
```

689

```
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 183
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H373A

<400> 183

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                  5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
```

690

```
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Ala Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 184
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q366D/H373E

<400> 184

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
```

691

```
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Glu Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 185
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q366V/H373V

<400> 185

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
```

```
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Val Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 186
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q366V/H373L

<400> 186

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
```

603

```
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Leu Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 187
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q366V/H373I

<400> 187

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Ile Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
```

691

```
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 188
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K161S

<400> 188

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Ser Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
```

695

405

<210> 189
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K161A

<400> 189

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Ala Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

696

<210> 190
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K161V

<400> 190
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Val Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 191
<211> 406

697

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H216S

<400> 191
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100   105   110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115   120   125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130   135   140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145   150   155   160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165   170   175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180   185   190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195   200   205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Ser Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210   215   220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225   230   235   240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245   250   255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260   265   270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275   280   285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290   295   300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305   310   315   320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325   330   335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340   345   350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355   360   365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370   375   380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385   390   395   400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405

<210> 192
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

698

<220>
<223> H216A

<400> 192
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100   105   110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115   120   125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130   135   140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145   150   155   160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165   170   175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180   185   190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195   200   205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Ala Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210   215   220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225   230   235   240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245   250   255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260   265   270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275   280   285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290   295   300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305   310   315   320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325   330   335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340   345   350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355   360   365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370   375   380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385   390   395   400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405

<210> 193
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H216K

ba

<400> 193
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Lys Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 194
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H216R

<400> 194
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

```
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Arg Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 195
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A

<400> 195

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
```

```
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 196
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222K

<400> 196

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
```

```
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Lys Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 197
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222V

<400> 197

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
```

```
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Val Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 198
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222N

<400> 198

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

000639

```
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Asn Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 199
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222E

<400> 199

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
```

```
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Glu Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 200
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222D

<400> 200

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

000641

```
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Asp Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 201
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H257A

<400> 201

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

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

<210> 202
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H257S

<400> 202

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

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

<210> 203
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222K/H257A

<400> 203

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Lys Arg Arg
    210                 215                 220
```

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

<210> 204
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H216A/H257A

<400> 204

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Ala Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
```

210

```
                245                 250                 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 205
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H216A/S222A

<400> 205

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu Ala Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
```

```
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 206
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S52A

<400> 206

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ala Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
```

212

```
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 207
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S60A

<400> 207

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ala Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
```

213

```
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 208
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> E394N/P395A/R396S

```
<400> 208
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
```

006649

```
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Asn Ala Ser Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 209
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R202S

```
<400> 209
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Ser Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
```

215

```
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 210
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A292N/A294S

<400> 210

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Asn Thr Ser Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
```

216

```
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 211
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> G318N

<400> 211

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Asn Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
```

218

405

<210> 212
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A175S

<400> 212
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

719

<210> 213
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K109N

<400> 213
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Asn Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 214
<211> 406
<212> PRT

$\alpha^{2\delta}$

<213> Homo sapiens

<220>
<223> A122N/G124S

<400> 214
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 215
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

221

000655

<223> A51N

<400> 215
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Asn Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 216
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T130N/E132S

<400> 216

222

000556

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Asn Val Ser Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 217
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A122N/G124S/E394N/P395A/R396S

<400> 217
```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
```

217

```
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Asn Ala Ala Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 218
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A122N/G124S/E394N/P395A/R396S/ G318N

```
<400> 218
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
```

```
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Asn Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Asn Ala Ala Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 219
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S52A/S60A

```
<400> 219
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ala Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ala Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
```

X25

```
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 220
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S52N/P54S

<400> 220
```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Asn Ser Ser Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
```

```
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 221
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S119N/L121S

<400> 221

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

000661

```
Arg Cys His Glu Gly Tyr Asn Leu Ser Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 222
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A

```
<400> 222
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
```

728

```
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 223
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Q66N/Y68S

<400> 223

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

```
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 224
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S52N/P54S/A122N/G124S/E394N/P395A/R396S

<400> 224

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


080864

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

<210> 225
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K109N/A292N/A294S

<400> 225

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Asn Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
```

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

<210> 226
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K109N/A175S

<400> 226

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Asn Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
```

232

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

<210> 227
<211> 417
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF

<400> 227

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro
            100                 105                 110
Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe Cys Arg Cys His Glu Gly
        115                 120                 125
Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr
    130                 135                 140
Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro
145                 150                 155                 160
Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro
                165                 170                 175
Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr
            180                 185                 190
Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys
        195                 200                 205
Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu
    210                 215                 220
Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile
225                 230                 235                 240
Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu
                245                 250                 255
```

```
Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu
            260                 265                 270
Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg
        275                 280                 285
Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr
    290                 295                 300
Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp
305                 310                 315                 320
Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu
                325                 330                 335
Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys
            340                 345                 350
Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr
        355                 360                 365
Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His
    370                 375                 380
Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys
385                 390                 395                 400
Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe
                405                 410                 415
Pro
```

<210> 228
<211> 414
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF

<400> 228

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys
        115                 120                 125
Leu Trp Glu Asp Asp Phe Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly
    130                 135                 140
Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg
145                 150                 155                 160
Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val
                165                 170                 175
Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn
            180                 185                 190
Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn
        195                 200                 205
Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His
    210                 215                 220
Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser
225                 230                 235                 240
Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu
                245                 250                 255
```

```
His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro
            260                 265                 270
Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu
        275                 280                 285
Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu
    290                 295                 300
Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln
305                 310                 315                 320
Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe
                325                 330                 335
Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser
            340                 345                 350
Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly
        355                 360                 365
Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val
    370                 375                 380
Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg
385                 390                 395                 400
Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405                 410
```

<210> 229
<211> 419
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF

<400> 229

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Gln
        115                 120                 125
Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
    130                 135                 140
Asp Asp Phe Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser
145                 150                 155                 160
Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu
                165                 170                 175
Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly
            180                 185                 190
Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe
        195                 200                 205
Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His
    210                 215                 220
Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln
225                 230                 235                 240
Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile
                245                 250                 255
Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val
            260                 265                 270
Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe
```

435

```
        275                 280                 285
Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly
    290                 295                 300
Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr
305                 310                 315                 320
Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile
                325                 330                 335
Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser
            340                 345                 350
Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr
        355                 360                 365
Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val
    370                 375                 380
Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu
385                 390                 395                 400
Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala
                405                 410                 415
Pro Phe Pro
```

<210> 230
<211> 411
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE

<400> 230

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly
            100                 105                 110
Cys Leu Trp Glu Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp
        115                 120                 125
Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro
    130                 135                 140
Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly
145                 150                 155                 160
Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu
                165                 170                 175
Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp
            180                 185                 190
Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn
        195                 200                 205
Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp
    210                 215                 220
Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val
225                 230                 235                 240
Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro
                245                 250                 255
Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly
        275                 280                 285
```

D36

```
Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val
    290                 295                 300
Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg
305                 310                 315                 320
Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly
                325                 330                 335
Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro
            340                 345                 350
His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser
        355                 360                 365
Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg
    370                 375                 380
Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro
385                 390                 395                 400
Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405                 410


<210> 231
<211> 408
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE

<400> 231
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
        115                 120                 125
Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu
    130                 135                 140
Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val
145                 150                 155                 160
Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly
                165                 170                 175
Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser
            180                 185                 190
Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala
        195                 200                 205
Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser
    210                 215                 220
Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr
225                 230                 235                 240
Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu
                245                 250                 255
Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu
            260                 265                 270
Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln
        275                 280                 285
Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val
    290                 295                 300
Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly
```

```
305                 310                 315                 320
Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp
                325                 330                 335
Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr
            340                 345                 350
His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln
        355                 360                 365
Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln
    370                 375                 380
Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly
385                 390                 395                 400
Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 232
<211> 413
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> 128P134delinsIEDICLPRWGCLWE

<400> 232

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Ile
        115                 120                 125
Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Cys Gly Lys
    130                 135                 140
Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile
145                 150                 155                 160
Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu
                165                 170                 175
Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr
            180                 185                 190
Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp
        195                 200                 205
Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp
    210                 215                 220
Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr
225                 230                 235                 240
Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His
                245                 250                 255
Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu
            260                 265                 270
Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val
        275                 280                 285
Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu
    290                 295                 300
Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln
305                 310                 315                 320
Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys
                325                 330                 335
```

```
Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly
            340                 345                 350
Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile
        355                 360                 365
Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr
    370                 375                 380
Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser
385                 390                 395                 400
Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405                 410
```

<210> 233
<211> 410
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S103S111delinsDICLPRWGCLWED

<400> 233

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
            100                 105                 110
Trp Glu Asp Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly
        115                 120                 125
Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile
    130                 135                 140
Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly
145                 150                 155                 160
Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val
                165                 170                 175
Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val
            180                 185                 190
Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu
        195                 200                 205
Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu
    210                 215                 220
Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro
225                 230                 235                 240
Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val
                245                 250                 255
Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe
            260                 265                 270
Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp
        275                 280                 285
Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu
    290                 295                 300
Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys
305                 310                 315                 320
Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr
                325                 330                 335
Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His
            340                 345                 350
Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp
```

000673

```
        355                 360                 365
Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val
    370                 375                 380
Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg
385                 390                 395                 400
Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405                 410
```

<210> 234
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H115S126delinsDICLPRWGCLWED

<400> 234

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
```

DOCKET

```
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 235
<211> 412
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128P134delinsDICLPRWGCLWED

<400> 235

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asp
        115                 120                 125
Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Cys Gly Lys Ile
    130                 135                 140
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
145                 150                 155                 160
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
                165                 170                 175
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
            180                 185                 190
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
        195                 200                 205
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
    210                 215                 220
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
225                 230                 235                 240
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
                245                 250                 255
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
        275                 280                 285
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
    290                 295                 300
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
305                 310                 315                 320
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
                325                 330                 335
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
            340                 345                 350
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
        355                 360                 365
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
    370                 375                 380
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
385                 390                 395                 400
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
```

405 410

<210> 236
<211> 419
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> P406insIEDICLPRWGCLW

<400> 236
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly
405 410 415
Cys Leu Trp

<210> 237
<211> 423
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> P406insGGGSIEDICLPRWGCLW

<400> 237

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Gly Gly Ser Ile Glu Asp Ile Cys Leu
                405                 410                 415
Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
            420
```

<210> 238
<211> 419
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> P406insDICLPRWGCLWED

<400> 238

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
                405                 410                 415
Trp Glu Asp
```

000578

<210> 239
<211> 423
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> P406insGGGSDICLPRWGCLWED

<400> 239

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Gly Gly Ser Asp Ile Cys Leu Pro Arg
                405                 410                 415
Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp
            420
```

<210> 240
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S103S111delinsSFGRGDIRNV

<400> 240
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val
100 105 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
115 120 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130 135 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145 150 155 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
165 170 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180 185 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195 200 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
210 215 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225 230 235 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245 250 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260 265 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu
275 280 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
290 295 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305 310 315 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325 330 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340 345 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
355 360 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370 375 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385 390 395 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 241
<211> 404
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<223> H115S126delinsSFGRGDIRNV

<400> 241
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100   105   110
Arg Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val Cys Thr Pro Thr
        115   120   125
Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala
    130   135   140
Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly
145   150   155   160
Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys
                165   170   175
Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys
            180   185   190
Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu
        195   200   205
His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala
    210   215   220
Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp
225   230   235   240
Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val
                245   250   255
Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala
            260   265   270
Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg
        275   280   285
Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met
    290   295   300
Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn
305   310   315   320
Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp
                325   330   335
Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly
            340   345   350
Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr
        355   360   365
Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp
    370   375   380
Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg
385   390   395   400
Ala Pro Phe Pro

<210> 242
<211> 409
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> T128P134delinsSFGRGDIRNV

<400> 242
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Ser
115 120 125
Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu
130 135 140
Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys
145 150 155 160
Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn
165 170 175
Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val
180 185 190
Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile
195 200 205
Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln
210 215 220
Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly
225 230 235 240
Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val
245 250 255
Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser
260 265 270
Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly
275 280 285
Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn
290 295 300
Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val
305 310 315 320
Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser
325 330 335
Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala
340 345 350
Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly
355 360 365
Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser
370 375 380
Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro
385 390 395 400
Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 243
<211> 418
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> P406insCSFGRGDIRNVC

<400> 243

218

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn
                405                 410                 415
Val Cys
```

<210> 244
<211> 422
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> P406insGGGSCSFGRGDIRNVC

<400> 244
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu

```
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Gly Gly Ser Cys Ser Phe Gly Arg Gly
                405                 410                 415
Asp Ile Arg Asn Val Cys
            420


<210> 245
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/ Gla intercambio FIX

<400> 245
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
```

```
1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 246
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H257A/ Gla intercambio FIX

<400> 246

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
```

```
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 247
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/H257A/ Gla intercambio FIX

<400> 247

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

252

```
    50                  55                  60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 248
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/M298Q

```
<400> 248
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
```

```
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 249
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H257A/M298Q

<400> 249

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

751

```
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 250
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/H257A/M298Q

```
<400> 250
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
```

```
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 251
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/A292N/A294S/Q366V

<400> 251

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

```
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Asn Thr Ser Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 252
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A175S/S222A/Q366V

<400> 252

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

257

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

<210> 253
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/Q366V

<400> 253

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

758

```
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
        355                 360                 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 254
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H257S/Q366V

<400> 254

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
```

000693

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

<210> 255
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/H373A

<400> 255

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
```

760

```
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Ala Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 256
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V158T/L287T/M298K

<400> 256

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Thr Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
```

761

```
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Thr Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Lys Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 257
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V21D/L287T/M298K

```
<400> 257
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Thr Leu
        275                 280                 285
```

762

```
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Lys Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 258
<211> 411
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S103S111delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V

<400> 258

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly
            100                 105                 110
Cys Leu Trp Glu Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp
        115                 120                 125
Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro
    130                 135                 140
Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly
145                 150                 155                 160
Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu
                165                 170                 175
Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp
            180                 185                 190
Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn
        195                 200                 205
Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp
    210                 215                 220
Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val
225                 230                 235                 240
Pro Val Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro
                245                 250                 255
Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly
        275                 280                 285
Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val
    290                 295                 300
Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg
```

```
305                 310                 315                 320
Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly
                325                 330                 335
Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro
            340                 345                 350
His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser
        355                 360                 365
Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg
    370                 375                 380
Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro
385                 390                 395                 400
Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405                 410


<210> 259
<211> 410
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S103S111delinsDICLPRWGCLWED/G237V

<400> 259
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
            100                 105                 110
Trp Glu Asp Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly
        115                 120                 125
Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile
    130                 135                 140
Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly
145                 150                 155                 160
Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val
                165                 170                 175
Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val
            180                 185                 190
Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu
        195                 200                 205
Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu
    210                 215                 220
Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro
225                 230                 235                 240
Val Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val
                245                 250                 255
Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe
            260                 265                 270
Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp
        275                 280                 285
Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu
    290                 295                 300
Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys
305                 310                 315                 320
Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr
                325                 330                 335
```

000698

```
Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His
            340                 345                 350
Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp
        355                 360                 365
Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val
    370                 375                 380
Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg
385                 390                 395                 400
Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405                 410
```

<210> 260
<211> 414
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H115S126delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V

<400> 260

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys
        115                 120                 125
Leu Trp Glu Asp Asp Phe Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly
    130                 135                 140
Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg
145                 150                 155                 160
Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val
                165                 170                 175
Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn
            180                 185                 190
Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn
        195                 200                 205
Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His
    210                 215                 220
Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser
225                 230                 235                 240
Thr Tyr Val Pro Val Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu
                245                 250                 255
His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro
            260                 265                 270
Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu
        275                 280                 285
Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu
    290                 295                 300
Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln
305                 310                 315                 320
Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe
                325                 330                 335
Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser
            340                 345                 350
Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly
```

006699

```
        355                 360                 365
Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val
    370                 375                 380
Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg
385                 390                 395                 400
Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405                 410
```

<210> 261
<211> 408
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H115S126delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V

<400> 261

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
        115                 120                 125
Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu
    130                 135                 140
Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val
145                 150                 155                 160
Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly
                165                 170                 175
Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser
            180                 185                 190
Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala
        195                 200                 205
Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser
    210                 215                 220
Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Val Thr
225                 230                 235                 240
Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu
                245                 250                 255
Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu
            260                 265                 270
Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln
        275                 280                 285
Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val
    290                 295                 300
Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly
305                 310                 315                 320
Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp
                325                 330                 335
Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr
            340                 345                 350
His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln
        355                 360                 365
Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln
    370                 375                 380
```

766

```
Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly
385                 390                 395                 400
Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 262
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H115S126delinsDICLPRWGCLWED/G237V

<400> 262

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Val Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380

Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
```

000701

Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 263
<211> 419
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128P134delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V

<400> 263
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Gln
115 120 125
Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
130 135 140
Asp Asp Phe Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser
145 150 155 160
Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu
165 170 175
Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly
180 185 190
Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe
195 200 205
Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His
210 215 220
Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln
225 230 235 240
Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Val Thr Thr Asn His Asp Ile
245 250 255
Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val
260 265 270
Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe
275 280 285
Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly
290 295 300
Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr
305 310 315 320
Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile
325 330 335
Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser
340 345 350
Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr
355 360 365
Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val
370 375 380
Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu
385 390 395 400
Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala
405 410 415
Pro Phe Pro

<210> 264
<211> 413
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128P134delinsIEDICLPRWGCLWE/G237V

<400> 264

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Ile
        115                 120                 125
Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Cys Gly Lys
    130                 135                 140
Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile
145                 150                 155                 160
Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu
                165                 170                 175
Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr
            180                 185                 190
Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp
        195                 200                 205
Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp
    210                 215                 220
Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr
225                 230                 235                 240
Tyr Val Pro Val Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His
                245                 250                 255
Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu
            260                 265                 270
Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val
        275                 280                 285
Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu
    290                 295                 300
Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln
305                 310                 315                 320
Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys
                325                 330                 335
Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly
            340                 345                 350
Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile
        355                 360                 365
Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr
    370                 375                 380
Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser
385                 390                 395                 400
Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405                 410
```

<210> 265
<211> 417
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S103S111delinsQRLMEDICLPRWGCLWEDDF/G237V

<400> 265
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro
            100   105   110
Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe Cys Arg Cys His Glu Gly
        115   120   125
Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr
    130   135   140
Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro
145   150   155   160
Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro
                165   170   175
Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr
            180   185   190
Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys
        195   200   205
Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu
    210   215   220
Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile
225   230   235   240
Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Val Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu
                245   250   255
Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu
            260   265   270
Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg
        275   280   285
Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr
    290   295   300
Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp
305   310   315   320
Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu
                325   330   335
Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys
            340   345   350
Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr
        355   360   365
Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His
    370   375   380
Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys
385   390   395   400
Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe
                405   410   415
Pro

<210> 266

<211> 412
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128P134delinsDICLPRWGCLWED/G237V

<400> 266
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100   105   110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asp
        115   120   125
Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Cys Gly Lys Ile
    130   135   140
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
145   150   155   160
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
                165   170   175
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
            180   185   190
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
        195   200   205
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
    210   215   220
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
225   230   235   240
Val Pro Val Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
                245   250   255
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
            260   265   270
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
        275   280   285
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
    290   295   300
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
305   310   315   320
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
                325   330   335
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
            340   345   350
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
        355   360   365
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
    370   375   380
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
385   390   395   400
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405   410

<210> 267
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S103S111delinsSFGRGDIRNV/G237V

<400> 267
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val
            100   105   110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115   120   125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130   135   140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145   150   155   160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165   170   175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180   185   190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195   200   205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
    210   215   220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Val Thr Thr
225   230   235   240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245   250   255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260   265   270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu
        275   280   285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
    290   295   300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305   310   315   320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325   330   335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340   345   350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355   360   365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370   375   380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385   390   395   400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405

<210> 268
<211> 404
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H115S126delinsSFGRGDIRNV/G237V

372

<400> 268
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100   105   110
Arg Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val Cys Thr Pro Thr
        115   120   125
Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala
    130   135   140
Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly
145   150   155   160
Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys
                165   170   175
Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys
            180   185   190
Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu
        195   200   205
His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala
    210   215   220
Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Val Thr Thr Asn His Asp
225   230   235   240
Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val
                245   250   255
Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala
            260   265   270
Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg
        275   280   285
Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met
    290   295   300
Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn
305   310   315   320
Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp
                325   330   335
Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly
            340   345   350
Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr
        355   360   365
Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp
    370   375   380
Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg
385   390   395   400
Ala Pro Phe Pro

<210> 269
<211> 409
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128P134delinsSFGRGDIRNV/G237V

<400> 269

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Ser
        115                 120                 125
Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Val Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu
    130                 135                 140
Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys
145                 150                 155                 160
Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn
                165                 170                 175
Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val
            180                 185                 190
Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile
        195                 200                 205
Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln
    210                 215                 220
Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Val
225                 230                 235                 240
Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val
                245                 250                 255
Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser
            260                 265                 270
Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly
        275                 280                 285
Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn
    290                 295                 300
Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val
305                 310                 315                 320
Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser
                325                 330                 335
Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala
            340                 345                 350
Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly
        355                 360                 365
Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser
    370                 375                 380
Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro
385                 390                 395                 400
Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 270
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> M298Q/H373F

<400> 270
```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
```

```
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 271
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S119N/L121S/A175S

<400> 271
```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
```

```
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Asn Leu Ser Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 272
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/A175S

<400> 272

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

```
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 273
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A122N/G124S/A175S

<400> 273

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
```

```
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 274
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/E39L/Q286R/M298Q

<400> 274

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

328

```
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 275
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/K42I/Q286R/M298Q/

<400> 275

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Ile Gln Tyr Ser Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
```

```
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 276
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/Q43S/Q286R/M298Q/

<400> 276

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

780

```
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 277
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/M18K/Q286R/M298Q/

<400> 277

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

281

000715

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

<210> 278
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/M18K/E39L/K42I/Q43S/Q286R/M298Q/

<400> 278

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

782

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

<210> 279
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/Q286R

```
<400> 279
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
```

283

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

<210> 280
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/Q286R/M298Q

<400> 280
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
115 120 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp

784

```
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405


<210> 281
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/Q286R/H373F

<400> 281
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
```

285

```
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 282
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V158D/Q286R/E296V/M298Q

<400> 282

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
```

286

```
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 283
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/V158D/E296V/M298Q

<400> 283

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
```

```
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 284
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/S222A

<400> 284

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
```

788

000722

```
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 285
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/T128N/P129A/S222A/Q286R

<400> 285

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Asn Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
```

789

```
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 286
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/T128N/P129A/Q286R/M298Q

<400> 286

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Asn Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
```

```
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 287
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/S222A/H257A/Q286R/M298Q

<400> 287

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
```


907725

405

<210> 288
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/Q286R/M298Q/H373F

<400> 288
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100   105   110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115   120   125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130   135   140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145   150   155   160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165   170   175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180   185   190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195   200   205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210   215   220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225   230   235   240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245   250   255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260   265   270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275   280   285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290   295   300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305   310   315   320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325   330   335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340   345   350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355   360   365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370   375   380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385   390   395   400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405

292

<210> 289
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S52A/S60A/V158D/E296V/M298Q

<400> 289
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ala Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ala Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 290
<211> 406

293

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S52A/S60A/Q286R

<400> 290
```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ala Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ala Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 291
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S52A/S60A/S222A

<400> 291
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ala Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ala Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 292
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/S52A/S60A/S222A/Q286R

795

<400> 292
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
35 40 45
Asp Gln Cys Ala Ala Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ala Cys Lys Asp
50 55 60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65 70 75 80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
85 90 95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
100 105 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
115 120 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130 135 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145 150 155 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
165 170 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180 185 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195 200 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
210 215 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225 230 235 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245 250 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260 265 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
275 280 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
290 295 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305 310 315 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325 330 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340 345 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
355 360 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370 375 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385 390 395 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 293
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 293
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp

```
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ala Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ala Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205

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

<210> 294
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/S52A/S60A/Q286R/M298Q

<400> 294

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

797

```
    50                  55                  60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 295
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S52A/S60A/S222A/H257A/Q286R/M298Q

<400> 295

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ala Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ala Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
```

298

```
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 296
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S52A/S60A/Q286R/H373F

<400> 296

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

799

```
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 297
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S52A/S60A/ Q286R/M298Q/H373F

<400> 297

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                  5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ala Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ala Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
```

```
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 298
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V158D/T239V/E296V/M298Q

<400> 298

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

801

```
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 299
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239V/Q286R

<400> 299

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

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

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405


<210> 300
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/T239V

<400> 300
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
```

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

<210> 301
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/S222A/T239V/Q286R

<400> 301

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
```

804

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

<210> 302
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239V/Q286R/M298Q

<400> 302

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val Asn
225                 230                 235                 240
```

```
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 303
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q

<400> 303

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
```

806

```
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 304
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/T239V/Q286R/M298Q

<400> 304

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1                5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
        275                 280                 285
```

```
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 305
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239V/Q286R/H373F

<400> 305

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
```

305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 306
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 306
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350

804

```
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 307
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V158D/T239I/E296V/M298Q

<400> 307

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
```

```
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 308
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239I/Q286R

<400> 308

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
```

811

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 309
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/T239I

<400> 309
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

812

<210> 310
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/S222A/T239I/Q286R

<400> 310
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
35 40 45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65 70 75 80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
85 90 95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
100 105 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
115 120 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130 135 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145 150 155 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
165 170 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180 185 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195 200 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
210 215 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile
225 230 235 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245 250 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260 265 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
275 280 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
290 295 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305 310 315 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325 330 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340 345 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
355 360 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370 375 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385 390 395 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 311

813

<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239I/Q286R/M298Q

<400> 311
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100   105   110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115   120   125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130   135   140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145   150   155   160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165   170   175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180   185   190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195   200   205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210   215   220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn
225   230   235   240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245   250   255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260   265   270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275   280   285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290   295   300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305   310   315   320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325   330   335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340   345   350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355   360   365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370   375   380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385   390   395   400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405

<210> 312
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

814

<220>
<223> S222A/T239I/H257A/Q286R/M298Q

<400> 312
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 313
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/T239I/Q286R/M298Q

815

<400> 313
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
35 40 45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65 70 75 80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
85 90 95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
100 105 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
115 120 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130 135 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145 150 155 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
165 170 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180 185 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195 200 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
210 215 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile
225 230 235 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245 250 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260 265 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
275 280 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
290 295 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305 310 315 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325 330 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340 345 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
355 360 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370 375 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385 390 395 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 314
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239I/Q286R/H373F

<400> 314
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu

816

```
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 315
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239I/Q286R/M298Q/H373F

<400> 315

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
```

817

```
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 316
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/S222A/Q286R/H373F

```
<400> 316
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
```

818

```
    50                  55                  60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 317
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/S222A/Q286R/M298Q

```
<400> 317
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
```

819

```
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 318
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/S222A/Q286R/M298Q/H373F

<400> 318

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

```
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305                 310                 315                 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
            340                 345                 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
        355                 360                 365

Cys Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
    370                 375                 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 319
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V158D/E296V/M298Q/H373F

<400> 319

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

821

```
       115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 320
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V158D/Q286R/E296V/M298Q/H373F

<400> 320

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

822

```
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 321
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H257A/Q286R/M298Q

<400> 321

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

823

```
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 322
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H257S/Q286R/M298Q

<400> 322

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

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

<210> 323
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/S222A/H257S/Q286R/

<400> 323

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
```

825

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

<210> 324
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/H257S/Q286R/M298Q

<400> 324

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
```

826

```
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ser Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 325
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> H257S/Q286R/M298Q/H373F

<400> 325

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ser Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
```

827

```
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 326
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/Q286R/M298Q/H373F

<400> 326

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
```

828

```
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 327
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/Q366V

```
<400> 327
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1                5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
                85                  90                  95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
            100                 105                 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
        115                 120                 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
    130                 135                 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
                165                 170                 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
            180                 185                 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
    210                 215                 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225                 230                 235                 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
                245                 250                 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
            260                 265                 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu
        275                 280                 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
    290                 295                 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
```

829

305 310 315 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325 330 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340 345 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly
355 360 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370 375 380

Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385 390 395 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 328
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S222A/Q286R/M298Q

<400> 328
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser

```
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 329
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T28N/P129A/A175S/Q366V

```
<400> 329
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
```

831

```
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 330
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A122N/G124S/A175S/Q366V

<400> 330

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Val Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
```

832

```
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 331
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/A175S/S222A

<400> 331

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
```

833

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 332
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A122N/G124S/A175S/S222A

<400> 332
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

834

<210> 333
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/A175S/Q286

<400> 333
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
115 120 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 334
<211> 406

835

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A122N/G124S/A175S/Q286R

<400> 334
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100   105   110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr
        115   120   125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130   135   140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145   150   155   160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165   170   175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180   185   190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195   200   205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210   215   220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225   230   235   240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245   250   255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260   265   270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275   280   285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290   295   300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305   310   315   320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325   330   335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340   345   350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355   360   365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370   375   380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385   390   395   400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405

<210> 335
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

836

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/T128N/P129A/A175S/S222A/Q286R

<400> 335
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
35 40 45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65 70 75 80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
85 90 95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
100 105 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
115 120 125
Asn Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130 135 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145 150 155 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser
165 170 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180 185 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195 200 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
210 215 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225 230 235 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245 250 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260 265 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
275 280 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
290 295 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305 310 315 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325 330 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340 345 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
355 360 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370 375 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385 390 395 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 336
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GlaIntercambioFIX/A122N/G124S/A175S/S222A/Q286R

837

<400> 336
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Ser Asp Gly
35 40 45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65 70 75 80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
85 90 95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
100 105 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys
115 120 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130 135 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145 150 155 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser
165 170 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180 185 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195 200 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg
210 215 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225 230 235 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245 250 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260 265 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
275 280 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro
290 295 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305 310 315 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325 330 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340 345 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
355 360 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370 375 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385 390 395 400

Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 337
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q

<400> 337
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu

S38

```
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 338
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q

<400> 338

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
```

835

```
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 339
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q

```
<400> 339
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
```

840

```
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 340
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A122N/G124S/A175S/S222A/H257A/Q286R/M298Q

<400> 340

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
```

```
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ala Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
Ala Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 341
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/A175S/Q286R/M298Q/H373F

<400> 341

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

```
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 342
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A122N/G124S/A175S/Q286R/M298Q/H373F

```
<400> 342
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Asn Asp Ser Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
```

843

```
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ser Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 343
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> E296V/M298Q

<400> 343

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

```
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 344
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V158E

<400> 344

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

845

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

<210> 345
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> E296R/M298K

<400> 345
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu

gsub

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

<210> 346
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K337A

<400> 346

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1                5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
```

847

```
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Ala Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405


<210> 347
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V158D/E296V/M298Q/K337A

<400> 347
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
```

```
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Ala Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 348
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V253N

<400> 348

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Asn Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
```

849

```
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405


<210> 349
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T106N

<400> 349
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Asn Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
```

850

Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 350
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T106N/V253N

<400> 350
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Asn Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Asn Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser

85

305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 351
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K143N/N145T

<400> 351
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Asn Arg
130 135 140
Thr Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335

852

000786

```
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 352
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R315N/V317T

<400> 352

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Asn Lys Thr Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
```

853

```
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 353
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K143N/N145T/R315N/V317T

<400> 353

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Asn Arg
    130                 135                 140
Thr Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
```

854

```
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405


<210> 354
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/M298Q

<400> 354
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
```

855

405

<210> 355
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> {Gla intercambio FIX /K43I}/T128N/P129A/Q286R/M298Q

<400> 355
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Ile Gln Tyr Ser Asp Gly
35 40 45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65 70 75 80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
85 90 95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
100 105 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
115 120 125
Asn Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130 135 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145 150 155 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
165 170 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180 185 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195 200 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
210 215 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225 230 235 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245 250 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260 265 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
275 280 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
290 295 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305 310 315 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325 330 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340 345 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly
355 360 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370 375 380

Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385 390 395 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

856

<210> 356
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N

<400> 356
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100   105   110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115   120   125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130   135   140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145   150   155   160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165   170   175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180   185   190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195   200   205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210   215   220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225   230   235   240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245   250   255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260   265   270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275   280   285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290   295   300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305   310   315   320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325   330   335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340   345   350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly Cys
        355   360   365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370   375   380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385   390   395   400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405

<210> 357
<211> 407

857

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> {Gla intercambio FIX /K43I}/Q286R/M298Q/Q366N

<400> 357
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Ile Gln Tyr Ser Asp Gly
35 40 45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65 70 75 80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
85 90 95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
100 105 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
115 120 125
Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130 135 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145 150 155 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
165 170 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180 185 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195 200 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
210 215 220
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr
225 230 235 240
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr
245 250 255
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg
260 265 270
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu
275 280 285
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro
290 295 300
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp
305 310 315 320
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly
325 330 335
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His
340 345 350
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly
355 360 365
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr
370 375 380
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val
385 390 395 400
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 358
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

858

<220>
<223> {Gla intercambio FIX /K43I}/
T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N

<400> 358
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Ile Gln Tyr Ser Asp Gly
35 40 45
Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60
Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
65 70 75 80
Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
85 90 95
Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
100 105 110
Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
115 120 125
Asn Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
130 135 140
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
145 150 155 160
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala
165 170 175
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala
180 185 190
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
195 200 205
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
210 215 220

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

<210> 359
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

859

<223> T128N/P129A/M298Q/H373F

<400> 359
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1   5   10   15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20   25   30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35   40   45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50   55   60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65   70   75   80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85   90   95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100   105   110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115   120   125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130   135   140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145   150   155   160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165   170   175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180   185   190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195   200   205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210   215   220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225   230   235   240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245   250   255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260   265   270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275   280   285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290   295   300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305   310   315   320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325   330   335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340   345   350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355   360   365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370   375   380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385   390   395   400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405

<210> 360
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V158D/Q286R/E296V/M298Q

<400> 360

860

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Asp Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Val Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 361
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> M298Q/Q366N/H373F

<400> 361

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

861

```
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 362
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239V/M298Q/H373F

```
<400> 362
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
```

862

```
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 363
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239I/M298Q/H373F

<400> 363

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
```

863

65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 364
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/Q286R/M298Q/Q366N/H373F

<400> 364
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95

804

```
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405


<210> 365
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239V/Q286R/M298Q/Q366N

<400> 365
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
```

865

```
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 366
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T239I/Q286R/M298Q/Q366N

<400> 366

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
```

866

```
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Asn Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 367
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q

<400> 367

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

867

```
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Val Asn
225                 230                 235                 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

<210> 368
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/S222A/T239V/H257A/Q286R/M298Q

<400> 368

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

868

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

<210> 369
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q/H373F

<400> 369

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
```

889

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

<210> 370
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q

<400> 370

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
        35                  40                  45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65                  70                  75                  80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
                85                  90                  95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
            100                 105                 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn
```

870

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

<210> 371
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q/H373F

<400> 371
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60
Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80
Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Asn
115 120 125
Ala Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ile Asn
225 230 235 240
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255

8 XI

```
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Gln Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305                 310                 315                 320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
                325                 330                 335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
            340                 345                 350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
        355                 360                 365
Ala Thr Val Gly Phe Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
    370                 375                 380
Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385                 390                 395                 400
Leu Arg Ala Pro Phe Pro
                405
```

872

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0040118

Bogotá D.C., Abril 29 de 2013 - 15:44:16

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 83.008.643 R

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	23071	07/03/2013		206.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23073	07/03/2013		206.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23074	07/03/2013		206.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23098	07/03/2013		320.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23099	07/03/2013		320.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23105	07/03/2013		480.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23108	07/03/2013		480.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23109	07/03/2013		480.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23155	07/03/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23156	07/03/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23158	07/03/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23159	07/03/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23160	07/03/2013		530.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
23	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	690.000.00
				$690.000.00

SON: **SEISCIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7
No. 13-109382- -00000-0000
Fecha: 2013-04-30 15:35:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 808

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-127271- -00009-0000
Fecha: 2013-04-30 15:35:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 808

Abril 29 de 2013 - 15:44:18

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0023068

Bogotá D.C., Marzo 07 de 2013 - 16:37:48

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	544911010	07/03/2013	72.935.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
				$450.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7

No. 13-109382- -00000-0000

Fecha: 2013-04-30 15:35:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 808

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-127271- -00009-0000

Fecha: 2013-04-30 15:35:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 808

000808