SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 13-225455- -00000-0000

Fecha: 2013-09-23 14:15:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 593 614

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-111636- -00012-0000

Fecha: 2013-09-23 14:15:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 593 614

Industria

SUPERIN

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN DIVISIONAL EXP:09-111.636

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TITULO:** **POLIPÉPTIDOS DE FACTOR VII MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS**

51. **CLASIFICACION INTRNACIONAL** C12N 9/64

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

DOMICILIO: California, Estados Unidos de América.

74. **APODERADO** **SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ**

22. **BOGOTÁ, D.C.**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 13-225455- -00000-0000
Fecha: 2013-09-23 14:15:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 598 614

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-111636- -00012-0000
Fecha: 2013-09-23 14:15:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 503 614

DIRECCIÓN DE NUEVA
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FU

1. Identificación del Tramite

☐ **Conversión** ☒ **División** ☐ **Fusión**

☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

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:

SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ	C.C. 22.468.787	147463 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**
notificaciones@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-3966

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente_____ _____ _____ De: _____ A: _____	Expediente **09-111.636** 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	
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ Nombre y apellidos	Firma
C.C. **22.468.787**	**Tarjeta Profesional 147463 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/US2008/004795**	**Fecha** **11 de Abril de 2008**
	Publicación Internacional No.	**WO 2008/127702 A3**	**Fecha** **23 de Octubre de 2008**
3	**TÍTULO DE LA INVENCIÓN** (200 caracteres o espacios máximos)		
	POLIPÉPTIDOS DE FACTOR VII MODIFICADOS 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**
	3.RUGGLES,	**Sandra, Waugh**	**Estadounidense**
	4.COUGHLIN,	**Shaun**	**Estadounidense**

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8	**DATOS INVENTOR (ES)**			
	DIRECCIÓN	**CIUDAD**	**ESTADO**	**PAÍS RESIDENCIA**
	1. 558 48th Avenue,	**San Francisco,**	**California 94121,**	**Estados Unidos de América**
	2. 3579 Sacramento Street,	**San Francisco,**	**California 94118,**	**Estados Unidos de América**
	3. 344 East Olive Avenue,	**Sunnyvale,**	**California 94086,**	**Estados Unidos de América**
	4. 2 Turtle Rock Ct.,	**Tiburon,**	**California 94920,**	**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
	LÓPEZ DÍAZ	**SILVANA MARIA**	**C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ**

DIRECCIÓN	**Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6**	No. TELÉFONO	**6181088**
CIUDAD	**Bogotá, D.C.**		
PAÍS	**Colombia**	CORREO ELECTRÓNICO	**notificaciones@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**	**60/923.512**	**2007/04/13**

2.

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° 13-089049// 13-093752	Fecha 06/09/2013 18/09/2013

16	FIRMA DEL APODERADO :

SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ
C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ

17	ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 362
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 38
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 7
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.

POLIPEPTIDOS DE FACTOR VII MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS

Solicitudes Relacionadas

Se reclama beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de EEUU No. 60/923,512, a Edwin Madison, Christopher Thanos, Sandra Waugh Ruggles y Shaun Coughlin, titulada "POLIPEPTIDOS DE FACTOR VII MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS", presentada el 13 de abril de 2007.

Esta solicitud está relacionada con la correspondiente Solicitud de EEUU No. 12/082, 662 a Edwin Madison, Christopher Thanos, Sandra Waugh Ruggles y Shaun Coughlin, titulada "POLIPEPTIDOS DE FACTOR VII MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS", la cual también reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de EEUU No. 60/923,512.

Donde sea permitido, la materia objeto de cada una de las solicitudes anteriormente mencionadas es incorporada por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

Se proporcionan proteínas terapéuticas modificadas. En particular se suministran polipéptidos de Factor VII modificados, los cuales incluyen Factor VIIa y otras formas de Factor VII, y usos de los mismos.

ANTECEDENTES

La hemostasia es el proceso fisiológico complejo que lleva al cese del sangrado. Las plaquetas, proteínas plasmáticas, vasos sanguíneos y las células endoteliales son los tres componentes de este proceso donde los tres juegan un papel importante en los eventos que siguen inmediatamente a la

lesión de los tejidos y el cual, bajo circunstancias normales, resulta en la formación rápida de un coágulo. Central a esto es la cascada de coagulación, una serie de eventos proteolíticos en los cuales ciertas proteínas plasmáticas (o factores de coagulación) son activadas secuencialmente en una "cascada" por otro factor de coagulación previamente activado, llevando a la rápida generación de trombina. Las grandes cantidades de trombina producida en esta cascada fuego funcionan para rajar fibrinógeno en los péptidos de fibrina que se requieren para la formación del coágulo.

Los factores de coagulación circulan como zimógenos de cadena simple inactivos, y son activados por medio de la división de una o más posiciones para generar una forma activada de dos cadenas de la proteína. El Factor VII (FVII), una proteína plasmática dependiente de vitamina K, inicialmente circula en la sangre como un zimógeno. El zimógeno FVII es activado por medio de la separación proteolítica en un sitio simple, Arg^{152}-Ile^{153}, resultando en una proteína de dos cadenas vinculada por una unión de disulfuro simple (FVIIa). El FVIIa une su cofactor, factor de tejido (TF), para formar un complejo en el cual el FVIIa puede eficientemente activar el factor X (FX) a FXa, iniciando así la serie de eventos que resulta en la formación de fibrina y la hemostasia.

Mientras que la hemostasia normal se logra en la mayoría de los casos, los defectos en el proceso pueden llevar a desordenes de sangrado en los cuales se prolonga el tiempo tomado para la formación de coágulo. Dichos desórdenes pueden ser congénitos o adquiridos. Por ejemplo, la hemofilia A y B son enfermedades heredadas caracterizadas por las deficiencias en el factor

VIII (FVIII) y el factor IX (FIX), respectivamente. La terapia de reemplazo es el tratamiento tradicional para la hemofilia A y B, e involucra la administración intravenosa de FVII o FIX, bien sea preparado de plasma humano o como proteínas recombinantes. En muchos casos, sin embargo, los pacientes desarrollan anticuerpos (también conocidos como inhibidores) contra las proteínas infundidas, lo cual reduce o niega la eficacia del tratamiento. El recombinante FVIIa (Novoseven®) ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes de hemofilia A o B que tienen inhibidores a FVIII o FIX, y también es utilizado para detener los episodios de sangrado o prevenir el sangrado asociado con trauma y/o cirugía. El recombinante FVIIa también ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con deficiencia de FVII congénita, y está siendo utilizado de forma incrementada en usos sin etiqueta, tales como el tratamiento del sangrado asociado con otros desórdenes de sangrado congénitos o adquiridos, trauma, y cirugía en pacientes no hemofílicos.

El uso de recombinante FVIIa para promover la formación de coágulos sobresalta su creciente importancia como un agente terapéutico. La terapia de FVIIa deja significantes necesidades médicas insatisfechas. Por ejemplo, con base en datos de pruebas clínicas, un promedio de 3 dosis de FVIIa por un periodo de tiempo de 6 horas o más es requerido para gestionar episodios de sangrado agudos en pacientes con hemofilia. Se necesitan variantes más eficaces de FVIIa para reducir estos requerimientos. Por lo tanto, entre los objetos acá, es un objeto el suministrar polipéptidos FVII modificados que son diseñados para tener propiedades terapéuticas mejoradas.

RESUMEN

Acá se suministran polipéptidos de Factor VII (FVII) modificados. En particular, acá se proporcionan polipéptidos FVII modificados que exhiben actividades procoagulantes. Los polipéptidos FVII son modificados en secuencia primaria comparado a un polipéptido FVII no modificado, y pueden incluir inserciones, supresiones y reemplazos de aminoácido. Los polipéptidos FVII modificados que acá se proveen incluyen polipéptidos FVII que exhiben resistencia incrementada a los afectos inhibidores del inhibidor del factor de tejido (TFPI), resistencia aumentada a los efectos inhibidores antitrombina-III (AT-III), unión ZN^{+2} reducida, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media mejorada, actividad catalítica incrementada en la presencia y/o ausencia de TF, y/o unión incrementada a las plaquetas activadas. Los polipéptidos FVII modificados pueden contener cualquier combinación de modificaciones acá suministradas, por la cual una o más actividades o propiedades del polipéptido son alteradas en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Típicamente el polipéptido FVII modificado retiene la actividad procoagulante. Acá también se suministran moléculas de ácido nucleico, vectores y células que codifican/expresan polipéptidos FVII modificados. Las composiciones farmacéuticas, artículos de manufactura, kits y métodos de tratamiento también son suministrados acá. Los polipéptidos FVII incluyen alélicas y variantes de especies 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 acá provista. Ejemplos de polipéptidos FVII son aquellos que incluyen la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3, así como las variantes de las mismas que tienen 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidades de secuencia con las mismas.

Los polipéptidos de factor VII (FVII) son modificados en secuencia primaria comparado a un polipéptido FVII no modificado, y pueden incluir inserciones, supresiones y reemplazos de aminoácido. Los polipéptidos FVII modificados que acá se proveen incluyen polipéptidos FVII que exhiben resistencia incrementada a los afectos inhibidores de TFPI, resistencia aumentada a los efectos inhibidores AT-III, unión ZN^{+2} reducida, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media mejorada, actividad catalítica incrementada en la presencia y/o ausencia de (factor de tejido) TF, y/o unión incrementada a las plaquetas activadas. Los polipéptidos FVII modificados pueden contener cualquier combinación de modificaciones acá suministradas, por la cual una o más actividades o propiedades del polipéptido son alteradas en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Los polipéptidos FVII pueden incluir otras modificaciones que alteran otras propiedades y/o actividades. Típicamente el polipéptido FVII modificado retiene la actividad procoagulante. Acá también se suministran moléculas de ácido nucleico, vectores y células que codifican/expresan polipéptidos FVII modificados. Las composiciones farmacéuticas, artículos de manufactura, kits y métodos de tratamiento también son suministrados acá.

7

45

En particular, se suministran polipéptidos alélicas de factor VII (FVII) modificados y variantes de especies de los mismos o fragmentos activos u otras variantes de los mismos. Acá se suministran polipéptidos FVII, incluyendo variantes alélicas y especies de los mimos o fragmentos activos de los mismos, que contienen una modificación que está en una posición correspondiente a la posición D196, K197 o K199 en un polipéptido FVII con una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3, o en los residuos correspondientes en un polipéptido FVII, que incluye variantes alélicas y especies de los mismos, fragmentos activos, y otros polipéptidos FVII modificados para otras actividades o propiedades. Los polipéptidos FVII contienen al menos una modificación en una posición correspondiente a la posición D196, K197 o K199 en un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 3 o en los residuos correspondientes en un polipéptido FVII. La modificación es una inserción y/o un reemplazo por un aminoácido hidrofóbico o acídico seleccionado de entre Val (V), Leu (L), Ile (I), Phe (F), Trp (W), Met (M), Tyr (Y), Cys (C), Asp (D) y Glu (E). Cuando se proporciona un fragmento activo, el fragmento activo incluye dicha modificación. Por ejemplo, se suministra los polipéptidos de factor VII (FVII) modificados, variantes alélicas y especies de los mismos o fragmentos activos u otras variantes de los mismos que también incluyen un reemplazo seleccionado de entre D196F, D196W, D196L, D196I, D196Y, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199D, K199E y K197Y.

Adicionalmente, los polipéptidos FVII modificados suministrados pueden contener una modificación adicional, que incluye un reemplazo, inserción o supresión de aminoácido, en otra posición en el polipéptido FVII. En algunos ejemplos, la modificación adicional es un reemplazo de aminoácido en una posición que corresponde a una posición seleccionada de entre D196, K197, K199, G237, T239, R290 y K341, en donde la primera modificación y la segunda modificación están en diferentes aminoácidos. Estas modificaciones pueden incluir, pero no están limitadas a 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, K341E, K341R, K341N, K341M, K341D y K341Q. Otras modificaciones de ejemplo que son inserciones de aminoácido, tales como, pero no limitados a, cualquiera de las siguientes inserciones: G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA y K197I198insS. Otros polipéptidos FVII modificados ejemplares incluyen las modificaciones siguientes: D196R/K197E/K199E, D196K/K197E/K199E, D196R/K197E/K199E/R290E, D196R/K197M/K199E, D196R/K197M/ K199E/R290E, D196K/K197L, D196F/ K197L, D196L/ K197L, D196M/K197L, D196W/K197L, D196F/K197E, D196W/K197E, K196V/K197E, K197E/K341Q,

K197L/K341Q, K197E/G237V/K341Q, K197E/K199E, K197E/G237V, K199E/K341Q o K197E/K199E/K341Q.

También se suministran polipéptidos FVII modificados, que incluyen variantes alélicas y especies de los mismos o fragmentos activos u otras variantes de los mismos, que también pueden contener modificaciones de aminoácido que corresponden a cualquiera o más de D196R, D 196 Y, D196F, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197E, K197D, K197L, K197M, K197M, Kl 971, K197V, K197F, K197W, K199D, K199E, G237W, G237I, G237V, R290M, R290V, K341M, K341D, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA o K197I198insS en un polipéptido FVII que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3 o en residuos correspondientes en un polipéptido FVII. Adicionalmente, estos polipéptidos FVII modificados pueden contener una modificación adicional que incluye un reemplazo, inserción o supresión de aminoácido, en otra posición en el polipéptido FVII. En algunos ejemplos, la modificación adicional puede ser un reemplazo de aminoácido en una posición que corresponde a una posición D196, K197, K199, G237, T239, R290 y K341, en donde la modificación adicional está en una posición diferente de la primera modificación. Por ejemplo, el polipéptido FVII modificado puede adicionalmente contener un reemplazo de aminoácido seleccionado de entre D196K, D196R, D 196 A, D196Y, D196F, D196M, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E,

10

18

K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341E, K341R, K341N, K341M, K341D y K341Q. Los ejemplos de dicho polipéptido FVII modificado son aquellos que incluyen modificaciones seleccionadas de entre D196R/R290E, D196R/R290D, D196R/K197E/K199E, D196K/K197E/K199E, D196R/K197E/K199E/R290E, D196R/K197M/K199E, D196R/K197M/K199E/R290E, D196K/K197L, D196F/K197L, D196L/K197L, D196M/K197L, D196W/K197L, D196F/K197E, D196W/K197E, K197L/K341Q, G237V/K341Q, K197E/G237V/K341Q, K197E/K199E, K197E/G237V, K199E/K341Q, K197E/K199E/K341Q y K196V/K197E.

En algunos casos, un polipéptido de factor VII (FVII) modificado, que incluye variante alélicas y especies de los mismos o fragmentos activos de los mismos u otras variantes de los mismos pueden incluir dos o más modificaciones en un polipéptido FVII, donde al menos dos de las modificaciones de aminoácido corresponde a D196K, D196R, D 196 A, D 196 Y, D196F, D196M, 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, K341E, K341R, K341N, K341M, K341D, K341Q, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY,

K197I198insA o K197I198insS en un polipéptido FVII que tiene o que incluye una secuencia de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO:3 o en residuos correspondientes en un polipéptido FVII. El polipéptido puede incluir más de dos modificaciones, tales como 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 modificaciones.

Ejemplos de estos son los polipéptidos FVII que incluyen modificaciones seleccionados de entre D196R/R290E, D196K/R290E, D196R/R290D, D196R/ K197E/ K199E, D196K/ K197E/ K199E, D196R/ K197E/ K199E/R290E, D196R/ K197M/ K199E, D196R/ K197M/ K199E/R290E, D196K/K197L, D196F/ K197L, D196L/ K197L, D196M/K197L, D196W/ K197L, D196F/K197E, D196W/K197E, D196V/K197E, K197E/K341Q, K197L/K341Q, G237V/K341Q, K197E/G237V/K341Q, K197E/K199E, K197E/G237V, K199E/K341Q, K197E/K199E/K341Q y K197E/G237V/M298Q.

Cualquiera de los polipéptidos FVII modificados mencionados anteriormente puede exhibir resistencia incrementada al inhibidor de camino de factor de tejido (TFPI) comparado con el polipéptido FVII sin modificar. En algunos ejemplos, el polipéptido FVII modificado es al menos aproximadamente o es 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 TFPI. Adicionalmente, estos polipéptidos FVII modificados también pueden contener un dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo, tal como 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de el dominio Gla heterólogo, para afectar la unión de fosfolípidos. Cualquiera y

todos los polipéptidos FVII modificados mencionados anteriormente también pueden incluir un intercambio Gla, que incluye intercambios Gla como acá se establecen como ejemplos y como se describen.

Un dominio Gla heterólogo puede ser seleccionado de los dominios Gla de Factor IX (FIX), Factor X (FX), protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína Gla de matriz, proteína 6 específica de arresto de crecimiento (Gas6) o proteína Z. En algunos ejemplos, el dominio Gla heterólogo en el polipéptido FVII modificado acá suministrado tiene una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 110-118, 120 y 121, o una porción suficiente de la misma para afectar la unión de fosfolípidos. Las modificaciones al polipéptido FVII pueden llevarse a cabo por medio de la remoción de todo o una porción contigua del dominio Gla FVII nativo, el cual puede incluir aminoácidos 1-45 en un polipéptido FVII que tiene o que incluye una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3, o en los residuos correspondientes en un polipéptido FVII, y reemplazándolo con el dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo para llevar a cabo la unión de fosfolípidos, tal como para incrementarlo. Dichas modificaciones pueden resultar en el polipéptido FVII modificado que exhibe unión de fosfolípidos aumentada en comparación con el polipéptido FVII sin modificar. Por ejemplo, el polipéptido modificado puede exhibir al menos aproximadamente 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 de unión de fosfolípidos aumentada.

Los polipéptidos FVII modificados pueden tener todo o una porción contigua del dominio Gla FVII nativo removido y reemplazado con el dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo para llevar a cabo la unión de fosfolípidos. Los ejemplos de dichos polipéptidos son aquellos en los cuales el dominio Gla FVII nativo incluye aminoácidos 1-45 en un polipéptido FVII que tiene o que incluye una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3, o en residuos correspondientes en un polipéptido FVII. Las modificaciones Gla incluyen, pero no están limitadas a, modificaciones entre Gla Intercambio FIX, Gla Intercambio FX, Gla Intercambio Prot C, Gla Intercambio Prot S y Gla Intercambio Trombina.

En virtud de un intercambio Gla el polipéptido FVII modificado puede exhibir una unión de fosfolípidos incrementada. Dicho incremento puede ser de al menos aproximadamente o 0.5%, 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 unión de fosfolípidos incrementada.

Los polipéptidos FVII modificados que contienen dominios Gla heterólogos pueden contener modificaciones adicionales en posiciones que resultan en o exhiben resistencia incrementada al inhibidor de camino de factor de tejido (TFPI) en comparación con un polipéptido FVII sin modificar. Ejemplos de dichas modificaciones son una o más modificaciones de aminoácido en las

posiciones seleccionadas de entre D196, K197, K199, G237, T239, R290, y K341 en un polipéptido FVII que tiene o que incluye una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3 o en residuos correspondientes en un polipéptido FVII. Específicamente, dichas modificaciones pueden incluir una o más modificaciones de aminoácido seleccionadas de entre D196K, D196R, D196A, D196Y, D196F, D196M, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K.197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341E, K341R, K341N, K341M, K341D, K341Q, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA y K197I198insS. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados que contienen un dominio Gla heterólogo también pueden contener los reemplazos de aminoácido y/o inserciones tales como, pero no limitadas a, D196R/R290E, D196K/R290E, D196R/R290D, D196R/ K197E/K199E, D196K/K197E/K199E, D196R/K197E/ K199E/R290E, D196R/ K197M/ K199E, y D196R/ K197M/K199E/R290E.

En algunos casos, dichas modificaciones adicionales resultan en una resistencia aumentada al TFPI del polipéptido modificado en comparación con el polipéptido FVII que no contiene la modificación, es decir, el polipéptido FVII sin modificar.

15.

Cualquiera de los polipéptidos FVII modificados descritos anteriormente, incluyen aquellos que exhiben resistencia incrementada al TFPI o unión aumentada a fosfolípidos, o cualquier combinación de los mismos, puede adicionalmente contener otras modificaciones, incluyendo cualquiera descrita en el arte. Dichas modificaciones adicionales de aminoácido pueden aumentar la resistencia a antitrombina-III (AT-III), incrementar la unión y/o afinidad a fosfolípidos, incrementar la afinidad para el factor de tejido (TF), incrementar la actividad intrínseca, alterar la conformación del polipéptido para alterar zimogenicidad, incluyendo la alteración de la conformación a una o más formas parecidas a zimógeno o una forma menos parecida a zimógeno, incrementar la resistencia a proteasas, disminuir la glicosilación, incrementar la glicosilación, reducir la inmunogenicidad, incrementar la estabilidad, y/o facilitar la vinculación del grupo químico. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados acá suministrados pueden contener modificaciones en la posición Q176, M298 o E296 en un polipéptido FVII que tiene o que incluye una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3 o en residuos correspondientes en un polipéptido FVII. En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados pueden contener adicionalmente modificaciones de aminoácido de entre Q176A, M298Q, E296V y/ E296A. En otros ejemplos, los polipéptidos FVII modificados pueden adicionalmente contener, adicional al intercambio Gla y/u otras modificaciones anotadas, una o más de las siguientes modificaciones de aminoácido: S278C/V302C, L279C/N301C, V280C/V301C, S281C/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, W41 D, 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, F71 E, 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, V158F, V158W, V158P, V158G, V158S, V158T, V158C, V158Y, V158N, V158E, V158R, V158K, V158H, V158D, V158Q, A175S, A175T, G179N, I186S, I186T, 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, F278 A, 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, P3O3S, P3O3ST, R304Y, R304F, R304L, R304M, R304G, R304T, R304A, R304S, R304N, L305V, L305Y, L305I, L305F, L305A, L305M, L305W, L3O5P, L305G, L305S, L305T, L305C, L305N, L305E, L305K, L305R, L305H, L305D, L3O5Q, M306D, M306N, D309S, D309T, Q312N, Q313K, Q313D, Q313E, S314A, S314V, S3141, 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, 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, I3ON/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/G291 S, D289N/G291T, L288N/R290S, L288N/R290T, L287N/D289S, L287N/D289, 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, 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, V158D/G237V/E296V/M298Q, K197E/G237V/M298Q, K197E/G237V/M298Q/K341Q, K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q, G237V/M298Q, G237V/M298Q/K341Q, M298Q/Gla Intercambio FIX, K197E/M298Q y M298Q/K341D.

Cualquiera de los polipéptidos FVII modificados acá suministrados puede contener uno o más modificaciones adicionales de aminoácidos que aumenta la resistencia a la antitrombina-III (AT-III), aumenta la unión y/o afinidad a los fosfolípidos, aumenta la afinidad del factor de tejido (TF), aumenta la actividad intrínseca, altera la conformación del polipéptido para alterar la zimogenicidad, aumenta la resistencia a las proteasas, disminuye la glicosilación, aumenta la glicosilación, reduce la inmunogenicidad, aumenta la estabilidad, y/o facilita la vinculación del grupo químico. Por ejemplo, la zimogenicidad alterada puede conferir una forma más parecida a zimógeno o una forma menos parecida a zimógeno. Dichos polipéptidos FVII modificados, por ejemplo, pueden incluir la sustitución de las posiciones 300-322, 305-322, 300-312, o 305-312 con los aminoácidos correspondientes de la tripsina, trombina o FX, o la sustitución de las posiciones 310-329, 311-322 o 233-329 con los aminoácidos correspondientes de la tripsina.

Los polipéptidos modificaods que acá se suministran incluyen aquellos en los cuales el polipéptido FVII sin modificar sólo contiene o incluye una secuencia de aminoácidos establecidos en la SEQ ID NO: 3. Ejemplos de polipéptidos FVII modificados son los polipéptidos que tienen o que incluyen una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 18-43, 125-150 y 206 a 250 o variantes alélicas o especies de las mismas. Las variantes alélicas o especies u otra variante puede tener 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia para el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 3, con exclusión de las modificaciones de aminoácidos. Las fuentes de polipéptidos FVII incluyen los seres humanos y otras especies no humanas. Los polipéptidos pueden ser polipéptidos maduros o polipéptidos precursores. En algunas modalidades, únicamente se modifica la secuencia primaria del polipéptido FVII. Adicionalmente, los polipéptidos FVII puede incluir una modificación química o una modificación post-translacional, tal como, pero no limitado a, glicosilación, carboxilación, hidroxilación, sulfonación, fosforilación, albuminación, o la conjugación a otra fracción, tal como una fracción de polietilenglicol (PEG).

Los polipéptidos FVII modificados pueden suministrarse como polipéptidos de cadena simple o como mezclas de cadena simple y cadena doble o formas de cadena múltiple, o como cadena doble, cadena de tres o de otras formas de cadena múltiple. Los polipéptidos FVII modificados pueden ser proporcionados como polipéptidos inactivos o activos. La activación puede

realizarse, por ejemplo, por desdoblamiento proteolítico por auto activación, desdoblamiento por Factor IX (FIXa), desdoblamiento por Factor X (FXa), desdoblamiento por factor XII (FXIIa), o desdoblamiento por trombina.

Los polipéptidos FVII modificados típicamente retienen una o más actividades o las propiedades del polipéptido FVII sin modificar. Las modificaciones pueden incluir modificaciones en el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 60 posiciones de aminoácidos, siempre que el polipéptido retenga al menos una actividad FVII del polipéptido FVII sin modificar. La retención de actividad puede ser al menos aproximadamente, el 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 la actividad del polipéptido FVII sin modificar. Las actividades incluyen, por ejemplo, la unión del factor de tejido (TF), la activación del factor X (FX), la activación del factor IX (FIX), unión de fosfolípidos, y la actividad de coagulación. Las actividades se pueden aumentar o disminuir. Entre los polipéptidos modificados acá suministrados se encuentran aquellos en los cuales se incrementa la actividad de coagulación. La actividad puede ser evaluada *in vitro* o *in vivo*.

También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos FVII modificados. También se proporcionan vectores, tales como vectores procariotas o vectores eucariotas, incluyendo vectores de mamíferos, y vectores virales. Ejemplos de vectores virales incluyen un adenovirus, un virus adeno asociado, un retrovirus, un virus de herpes, un lentivirus, un poxvirus, y

vectores de citomegalovirus. También se proporcionan células que contienen las moléculas de ácido nucleico o los vectores. Las células pueden ser eucariotas, tales como células de mamíferos o de levadura, o células procariotas. Las células de mamíferos incluyen, por ejemplo, células de riñón de hámster bebé (BHK.-21) o células 293 y células CHO. Las células pueden ser cultivadas en condiciones en las que se expresa el polipéptido FVII modificado. Esta puede ser secretada. Se suministra el polipéptido FVII modificado producido por dichas células.

También se proporcionan composiciones que contienen los polipéptidos FVII modificados acá suministrados. En particular, se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen dichos polipéptidos. Las composiciones pueden contener una concentración o cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido FVII modificado, o una molécula de ácido nucleico o un vector o una célula acá suministrada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas para administración de dosis única o de dosis múltiple. La composición farmacéutica puede ser en cualquier forma, como un líquido, gel o sólido, y provista en forma de cápsulas, contenedores y otros vehículos adecuados. Estas pueden ser formuladas para dilución antes de la administración o en cualquier otra forma adecuada. La cantidad puede depender de la enfermedad tratada y/o el individuo tratado y, en caso necesario, puede determinarse empíricamente. La composición farmacéutica puede formularse por cualquier vía de administración, incluyendo, por ejemplo,

administración local, sistémica o tópica, o formulada para administración oral, nasal, pulmonar, bucal, transdérmica, subcutánea, intraduodenal, enteral, parenteral, intravenosa o intramuscular. Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas para liberación controlada.

También se proporcionan métodos de tratamiento y usos de las composiciones para el tratamiento. Las composiciones farmacéuticas se administran o se formulan para administración a un sujeto que tiene una enfermedad o condición que es tratada por la administración de FVII, incluyendo el tratamiento mediante la administración de FVII activo (FVIIa). El tratamiento con la composición farmacéutica aminora o alivia los síntomas asociados con la enfermedad o condición. La administración puede ser seguida o acompañado por la vigilancia a un sujeto para cambios en los síntomas asociados con la enfermedad mediada por FVII o condición. Las enfermedades o afecciones tratadas, incluyen, pero no se limitan a, desórdenes de coagulación sanguínea, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilias, deficiencia de factor VII y trastornos de sangrado. Ejemplos de estos son la hemofilia A o hemofilia B o hemofilia C. La hemofilia puede ser congénita o adquirida, como por ejemplo debido a una complicación hemorrágica por una cirugía o traumatismo. El sangrado puede manifestarse como hemartrosis aguda, artropatía hemofílica crónica, hematomas, hematuria, hemorragias del sistema nervioso central, hemorragias gastrointestinales o hemorragia cerebral, y puede ser consecuencia de, por ejemplo, extracción dental o cirugía, tal como, por ejemplo, angioplastia, cirugía pulmonar, cirugía

abdominal, cirugía espinal, cirugía cerebral, cirugía vascular, cirugía dental, o cirugía de trasplante de órganos, tal como el trasplante de médula ósea, corazón, pulmón, páncreas e hígado. El sujeto puede tener anticuerpos contra el factor VIII o factor IX. El tratamiento puede ir acompañado de, o se administran de forma secuencial o intermitente, con uno o más factores de coagulación adicionales, tales como, por ejemplo, factores de coagulación de plasma o recombinantes purificadas, procoagulantes, tales como vitamina K, derivados de la vitamina K e inhibidores de la proteína C, plasma, plaquetas, glóbulos rojos y corticosteroides. Las composiciones farmacéuticas pueden ser utilizadas con composiciones que contengan esos otros factores de coagulación.

Se suministran artículos de fabricación que contienen material de embalaje y una composición farmacéutica contenida en el material de embalaje, y, opcionalmente, instrucciones para su administración. Por ejemplo, el polipéptido FVII modificado en la composición farmacéutica puede ser para el tratamiento de una enfermedad mediada por FVII o trastorno, y el material de embalaje puede incluir una etiqueta que indica que el polipéptido FVII modificado se utiliza para el tratamiento de una enfermedad mediada por FVII o trastorno. También se proporcionan kits que contienen las composiciones farmacéuticas y un dispositivo para la administración de la composición y, opcionalmente, instrucciones para su administración.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra la cascada de coagulación. La figura muestra la vía intrínseca y la vía extrínseca de coagulación para la producción independiente de FXa y la convergencia de las vías a una vía común para generar trombina y fibrina para la formación de un coágulo. Estas vías están interconectadas. La figura muestra el orden de las moléculas implicadas en la cascada de activación en el que un zimógeno se convierte en una proteasa activa por medio de la ruptura de uno o más enlaces peptídicos. La proteasa activada luego sirve como activador de la proteasa para la molécula de zimógeno siguiente en la cascada, en última instancia, resultando en la formación de coágulos.

La **Figura 2** muestra el modelo basado en células de coagulación (ver por ejemplo, Hoffman *et al.* (2001) Thromb Haemost 85:958-965). La figura muestra los eventos de coagulación a medida que son separados en tres fases, donde la iniciación de la coagulación se efectúa mediante la activación de FX a FXa por el complejo TF/FVIIa sobre la célula de apoyo TF, lo que resulta en la generación de una pequeña cantidad de trombina después de la activación por FXa / FVA. La amplificación se produce cuando la trombina se une y activa las plaquetas, y se inicia la activación de una cantidad suficiente de los factores de coagulación adecuados para formar los complejos FVIIIa/FIXa y FVa/FXa. La propagación de la coagulación se produce en la superficie de un gran número de plaquetas activadas en el sitio de la lesión, resultando en un estallido de la generación de trombina, que es lo suficientemente grande para generar

suficiente fibrina de fibrinógeno para establecer un coágulo en el sitio de la lesión.

La **Figura 3** muestra los mecanismos por los cuales la FVIIa puede iniciar la formación de trombina. La figura ilustra la vía dependiente de TF de la generación de trombina FVIIa, que actúa en la superficie de una célula de rumbo TF y consiste en complejos de FVIIa con TF previo a la activación de FX a FXa. La figura también muestra la vía independiente de TF de generación de trombina FVIIa, durante la cual la FVIIa se une a los fosfolípidos en las plaquetas activadas y activa FX a FXa, que a su vez con los complejos con FVa para unir protrombina en trombina.

La **Figura 4** muestra el complejo inhibidor cuaternario que se produce cuando el complejo TFPI/FXa se une al complejo TF/FVIIa. El TFPI contiene tres dominios Kunitz. El dominio Kunitz 2 (K-2) interactúa e inhibe FXa, mientras que el dominio Kunitz (K-1) interactúa e inhibe FVIIa.

La **Figura 5** muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de los primeros dominios de Kunitz de (a) $BPTI^{5L15}$ (posiciones de aminoácidos 1 a 55 de la SEQ ID NO:106) y TFPI-2 (posiciones de aminoácidos 14-65 de la SEQ ID NO:105), y (b) TFPI-1 (posiciones de aminoácidos 26-76 de la SEQ ID NO:102) y TFPI-2 (posiciones de aminoácidos 14-65 de la SEQ ID NO:105), y muestra los aminoácidos conservados.

La **Figura 6** muestra el modelo de homología para determinar los residuos de contacto en la interfaz de la interacción entre FVIIa y TFPI. La estructura de dominio Kunitz 1 (K1) de TFPI-2 fue tomada de l estructura de

cristal de complejo de tripsina/TFPI y modelado en $BPTI^{5L15}$ en la estructura de cristal de TF/FVIIa/$BPTI^{5L15}$. La mutagénesis *in silico* se llevó a cabo para adaptar los aminoácidos correspondientes de TFPI-1 K1 al modelo. Los residuos de contacto de FVIIa que puedan participar en la interacción con TFPI en la interfaz proteína-proteína fueron identificados y establecidos como candidatos para la mutagénesis en el desarrollo de polipéptidos FVII resistentes a TFPI.

La **Figura 7** muestra la interacción modelada entre FVIIa y TFPI. En particular, la figura muestra los residuos de contacto de FVII que están presentes en la interfaz del FVIIa y la interacción de TFPI, y los residuos de contacto correspondientes de TFPI, que forman contactos electrostáticas complementarios.

DESCRIPCION DETALLADA

Esquema
A. Definiciones
B. Información general de Hemostasia
    1. Adhesión y agregación plaquetaria
    2. Cascada de la coagulación
        a. Iniciación
        b. Amplificación
        c. Propagación
    3. Regulación de la Coagulación
C. Factor VII (FVII)
    1. Estructura y organización de FVII
    2. Modificaciones post-traslacionales
    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 un biofarmacéutico
D. Polipéptidos FVII modificados
    1. Resistencia a inhibidores

a. TFPI

Modificaciones para llevar a cabo una mayor resistencia a TFPI

b. Antitrombina III (AT-III)

Modificaciones para llevar a cabo una mayor resistencia a la AT-III

2. Unión a Plaquetas Activadas

Modificación por medio de la introducción de un dominio Gla heterólogo

3. Combinaciones y modificaciones adicionales

a. Modificaciones que aumentan la actividad intrínseca

b. Modificaciones que aumentan la resistencia a las proteasas

c. Modificaciones que aumentan la unión a fosfolípidos

d. Modificaciones que alteran la glicosilación

e. Modificaciones que facilitan la vinculación del grupo químico

f. Ejemplos de mutantes de combinación FVII

E. Diseño y métodos para modificar FVII

1. Racional
2. Empírica (es decir, de selección)
   a. Mutagénesis aleatoria
   b. Mutagénesis enfocada
   c. Proyección
3. Selección de variantes FVII

F. Producción de polipéptidos FVII

1. Vectores y células
2. Sistemas de expresión
   a. Expresión procariota
   b. Levadura
   c. Insectos y células de insecto
   d. Células de mamíferos
   e. Plantas
2. Purificación
3. Proteínas de fusión
4. Modificaciones de polipéptido
5. Secuencias de nucleótido

G. Evaluación de las actividades del polipéptido FVII modificado

1. Ensayos *in vitro*
   a. Modificación post-translacional
   b. Actividad proteolítica
   c. Actividad de coagulación
   d. Unión y/o inhibición por otras proteínas
   e. Unión de fosfolípidos
2. Modelos animales no humanos
3. Ensayos clínicos

H. Formulación y administración
    1. Formulaciones
        a. Dosis
        b. Formas de dosificación
    2. Administración de polipéptidos FVII modificados
    3. Administración de ácidos nucleicos de codificación polipéptidos FVII modificados (terapia génica)
I. Usos Terapéuticos
    1. Trastornos congénitos de sangrado
        a. Hemofilia
        b. Deficiencia de FVII
        c. Otros
    2. Trastornos de sangrado adquiridos
        a. Trombocitopenia adquirida por quimioterapia
        b. Otras coagulopatías
        c. Sangrado adquirido por transplante
        d. Sangrado inducido por terapia anticoagulante
        e. Hemofilia adquirida
    3. Sangrado de trauma y cirugía
J. Terapias de combinación
K. Artículos de fabricación y kits
L. Ejemplos

A. DEFINICIONES

A menos que se define de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por una persona versada en la materia a la cual la invención pertenece. Todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes publicadas y publicaciones, secuencias de banco de genes (Genbank), bases de datos, sitios Web y otros materiales publicados a los que se hace referencia a lo largo de la divulgación completa aquí, a menos que se indique lo contrario, se incorporan por referencia en su totalidad. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos en este documento, los de esta sección prevalecen. Cuando se haga referencia a una URL u otro tales como

identificador o dirección, se entiende que esos identificadores pueden cambiar y la información particular en Internet puede ir y venir, pero la información equivalente se puede encontrar buscando en Internet. Las referencias de allí evidencian la disponibilidad y la difusión pública de dicha información.

Como se usa aquí, la vía de coagulación 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 cascada de coagulación o vía, una proteína inactiva de una proteasa de serina (también llamado zimógeno) se convierte en una proteasa activa por la ruptura de uno o más enlaces peptídicos, que luego sirve como activador de la proteasa para la molécula de zimógeno siguiente en la cascada. En el paso proteolítico final de la cascada, el fibrinógeno es proteolíticamente roto por la trombina a fibrina, que luego es vinculado de forma cruzada en el sitio de la lesión para formar un coágulo.

Como se usa aquí, "hemostasia" se refiere a la interrupción de la hemorragia o flujo de sangre en un órgano o parte del cuerpo. El término hemostasia puede abarcar todo el proceso de coagulación de la sangre para prevenir la pérdida de sangre después de una lesión de los vasos sanguíneos posterior a la disolución del coágulo de sangre después de la reparación de tejidos.

Como se usa aquí, "coagulación" se refiere a la formación de un coágulo de fibrina insoluble, o el proceso por el cual los factores de coagulación de la sangre que interactúan en cascada de coagulación, resultando en la formación de un coágulo de fibrina insoluble.

Como se usa aquí, una "proteasa" es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces covalentes peptídicos. Estas designaciones incluyen formas de zimógeno y activado simple, dos y múltiples formas de la cadena de la misma. Para mayor claridad, la referencia a las proteasas se refiere a todas las formas. Las proteasas incluyen, por ejemplo, proteasas de serina, proteasas de cisteína, proteasas aspárticas, treonina y metalo-proteasas en función de la actividad catalítica de su sitio activo y el mecanismo de ruptura de los enlaces peptídicos de un sustrato objetivo.

Como se usa aquí, las proteasas de serina o endopeptidasas de serina se refiere a una clase de peptidasas, que se caracterizan por la presencia de un residuo de serina en el sitio activo de la enzima. Las proteasas de serina participan en un amplio rango de funciones en el cuerpo, incluyendo la coagulación de la sangre e inflamación, así como el funcionamiento de las enzimas digestivas en procariotas y eucariotas. El mecanismo de ruptura por proteasas de serina se basa en el ataque nucleofílico de un enlace peptídico objetivo de una serina. La cisteína, treonina o moléculas de agua asociadas con el aspartato o metales también pueden desempeñar este papel. Las cadenas alineadas de lado de la serina, histidina y aspartato forman una tríada catalítica común a la mayoría de las proteasas de serina. El sitio activo de serina proteasas tiene la forma de una hendidura donde se une el sustrato polipéptido.

Como se usa aquí, el factor VII (FVII, F7, también conocido como Factor 7, factor de coagulación VII, factor de suero FVII, acelerador de conversión de

protrombina de suero, SPCA, proconvertina y eptacog alfa) se refiere a una proteasa de serina que es parte de la cascada de coagulación. FVII incluye un dominio Gla, dos dominios EGF (EGF-1 y EGF-2), y un dominio de la proteasa de serina (o dominio SI peptidasa) que está altamente conservada entre todos los miembros de la familia SI peptidasa de proteasas de serina, como por ejemplo con la quimotripsina. La secuencia de un precursor ejemplar FVII que tiene un péptido señal y propéptido se establece en la SEQ ID NO:1. Un polipéptido FVII maduro ejemplar se establece en la SEQ ID NO:3. El FVII ocurre como un zimógeno de cadena simple, un polipéptido de cadena doble parecido a zimógeno y una forma de cadena doble completamente activada. La activación completa, que se produce al cambio en la conformación de una forma parecida a zimógeno, se produce al unirse a co-factor del factor de tejido. Además, las mutaciones pueden ser introducidas que resultan en el cambio de conformación en la ausencia del factor de tejido. Por lo tanto, la referencia a FVII incluye formas de una cadena simple y cadena doble de la misma, incluyendo formas parecidas a zimógeno cadenas dobles completamente activadas.

La referencia al polipéptido FVII también incluye polipéptidos precursores y polipéptidos FVII maduros en formas de cadena simple y cadena doble, formas truncadas de las mismas que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especies, variantes codificadas por variantes de empalme, y otras variantes, incluyendo los polipéptidos que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99% o más de secuencia identidad para el polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO:1 o la forma madura de la misma. Se incluyen los polipéptidos FVII modificados, tales como aquellos de las SEQ ID NOS:18-43, 125-150 o 206-150 y variantes de los mismos. También se incluyen aquellos que retienen al menos una actividad de un FVII, tales como TF vinculante, factor X vinculante, fosfolípidos vinculantes, y/o actividad coagulante de un FVII. Al mantener la actividad, la actividad puede ser alterada, tal como reducida o aumentada, en comparación con polipéptido FVII tipo salvaje siempre y cuando el nivel de actividad retenida sea suficiente para producir un efecto detectable. Los polipéptidos FVII incluyen, pero no se limitan a, isoformas de tejidos específicos y variantes alélicas del mismo, moléculas sintéticas preparado por la translación de ácidos nucleicos, proteínas generadas por síntesis química, tales como síntesis que incluyen ligadura de polipéptidos más cortos, mediante métodos recombinantes, proteínas aisladas a partir de tejido y células humano y no humano, polipéptidos FVII quiméricos y formas modificadas de los mismos. Los polipéptidos FVII también incluyen fragmentos o porciones de FVII que son de una longitud suficiente o que incluyen regiones apropiadas para conservar al menos una actividad (tras la activación en caso necesario) de un polipéptido maduro de longitud completa. Los polipéptidos FVII también incluyen aquellos que contienen modificaciones químicas o modificaciones posttranslacionales y los que no contienen modificaciones químicas o posttranslacionales. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, albuminación, glicosilación, farnisilación,

carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptido conocidas en el arte.

Polipéptidos FVII ejemplares son aquellos de mamíferos, incluidos los de origen humano. Las secuencias de aminoácidos ejemplares de FVII de origen humano están establecidas en las SEQ ID NOS: 1, 2 y 3. Las variantes ejemplares de dichos polipéptidos FVII de humano, incluye cualquiera de los polipéptidos precursores establecidos en las SEQ ID NOS: 44-100. Los polipéptidos FVII también incluyen los de origen no humano incluyendo, pero no limitado a, murino, caninos, felinos, leporino, aviar, bovino, ovino, porcino, equino, piscino, ranino, y polipéptidos factor VII de otro 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), rata (*Rattus norvegicus*, SEQ ID NO:9), macacos rhesus (*Macaca mulata*, SEQ ID NO: 10), cerdo (*Sus scrofa*, SEQ ID NO:11), perro (*Canisfamiliaris*, 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 materia reconoce que las posiciones de referencia del polipéptido factor VII maduro (SEQ ID NO:3) difieren por 60 residuos de aminoácidos en comparación con la isoforma de un precursor polipéptido FVII establecidos en la SEQ ID NO:1, que es la isoforma de un factor VII polipéptido

que contiene el péptido señal y las secuencias propéptido. Así, el primer residuo de aminoácido de la SEQ ID NO:3 "corresponde a" al sexagésimo primero (61ª) residuos de aminoácido de la SEQ ID NO:1. Aquellos versados en la materia también reconocen que las posiciones de referencia de los polipéptido de factor VII maduros (SEQ ID NO:3) difieren por 38 residuos de aminoácido en comparación con el polipéptido FVII precursor establecido en la SEQ ID NO:2, que es el polipéptido factor VII de isoforma b que contiene el péptido de señal y las secuencias propéptido. Así, el primer residuo de aminoácido de la SEQ ID NO:3 "corresponde a" el trigésimo noveno (39º) residuo de aminoácido de la SEQ ID NO:2.

Como se usa aquí, los residuos correspondientes a los residuos que se producen en los loci alineados. Los polipéptidos relacionados o variantes se alinean por cualquier método conocido para aquellos expertos en la materia. Estos métodos suelen maximizar las coincidencias, e incluyen métodos tales como el uso de las alineaciones manuales y mediante el uso de los programas de alineación numerosos disponibles (por ejemplo, BLASTP) y otros conocidos para aquellos versados en la materia. Por medio de la alineación de las secuencias de polipéptidos, un experto en la materia puede identificar los residuos correspondientes, utilizando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. Por ejemplo, mediante la alineación de las secuencias de polipéptidos factor VII, un experto en la materia puede identificar los residuos correspondientes, utilizando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. Por ejemplo, la alanina en el aminoácido posición 1 (A1) de la

SEQ ID NO:3 (factor VII maduro) corresponde a la alanina en el aminoácido posición 61 (A61) de la SEQ ID NO:1, y la alanina en el aminoácido posición 39 (A39) de la SEQ ID NO:2. En otros casos, las regiones correspondientes pueden ser identificadas. Por ejemplo, el dominio Gla corresponde a las posiciones de aminoácidos de A1 hasta F45 de la SEQ ID NO:3, a las posiciones de aminoácido A61 a S105 de la SEQ ID NO:1 y a las posiciones de aminoácidos A39 a S83 de la SEQ ID NO:2. Un experto en la materia también puede emplear residuos de aminoácidos conservados como guías para encontrar los correspondientes residuos de aminoácidos entre y dentro de las secuencias de humanos y no humanos. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos S43 y E163 de la SEQ ID NO:3 (humanos) corresponden a S83 y E203 de la SEQ ID NO:4 (bovinos). Las posiciones correspondientes también se pueden basar en las alineaciones estructurales, por ejemplo mediante el uso de las alineaciones simuladas en computador de la estructura de proteínas. En otros casos, las regiones correspondientes pueden ser identificadas.

Como se usa aquí, una "proregión", "propéptido," o "pro secuencia", se refiere a una región o un segmento que se rompe para producir una proteína madura. Esto puede incluir segmentos que funcionan para suprimir la actividad proteolítica enmascarando los mecanismos catalíticos y evitar así la formación de los catalizadores intermedios (es decir, por la oclusión estérica del sitio de unión del sustrato). Un proregión es una secuencia de aminoácidos colocados en el extremo amino de un polipéptido biológicamente activo maduro y pueden

ser tan poco como algunos aminoácidos o pueden ser una estructura de multidominio.

Como se usa aquí, "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 indica una proteína para la secreción por medio del retículo endoplásmico (ER) vía de Golgi y se corta después de la inserción en el ER durante la translación. Una secuencia de propéptido típicamente funciona en modificaciones post-translacionales de la proteína y se rompe antes de la secreción de la proteína de la célula. Por lo tanto, un polipéptido FVII maduro es típicamente una proteína secretada. En un ejemplo, un polipéptido FVII maduro de humano se expone en la SEQ ID NO:3. La secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:3 difiere de la de los precursores polipéptidos establecidos en las SEQ ID NOS: 1 y 2 en que la SEQ ID NO: 3 carece de secuencia de señales, lo cual corresponde a residuos de aminoácidos 1-20 de las SEQ ID NOS: 1 y 2; y también carece de secuencia de propéptido, lo cual corresponde a residuos de aminoácidos 21-60 de la SEQ ID NO: 1 y residuos de aminoácidos 21-38 de la SEQ ID NO:2. La referencia a un polipéptido FVII maduro abarca la forma de zimógeno de cadena simple y la forma cadena doble.

Como se usa aquí, "tipo salvaje" o "nativo" con referencia a FVII se refiere a un polipéptido FVII codificado por un gen FVII nativo o que ocurre naturalmente, incluyendo variantes alélicas, que está presente en un organismo, incluyendo un humano y otros animales, en la naturaleza. La

referencia al factor VII tipo salvaje sin referencia a una especie, se pretende abarcar cualquier especies de un factor VII tipo salvaje. Incluido entre los polipéptidos FVII tipo salvaje se encuentra el polipéptido precursor codificado, fragmentos del mismo, y formas procesadas del mismo, como una forma madura que carece de señal de péptido así como cualquier forma pre o post-translacionalmente procesada o modificada del mismo. También se incluyen entre los polipéptidos FVII nativos aquellos que son post-translacionalmente modificados, incluyendo pero no limitado a, la modificación por glicosilación, carboxilación e hidroxilación. Los polipéptidos FVII nativos también incluyen formas de cadena simple y de cadena doble. Por ejemplo, los seres humanos expresan FVII nativo. La secuencia de aminoácidos de los ejemplares de tipo salvaje FVII humano establecido en las SEQ ID NOS: 1, 2, 3 y las variantes alélicas establecidas en las SEQ ID NOS:44-100 y las formas maduras de las mismas. Otros animales producen FVII nativas, 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), rata (*Rattus norvegicus*, SEQ ID NO: 9), macacos rhesus (*Macaca mulata*, SEQ ID NO: 10), cerdo (*Sus scrofa*, SEQ ID NO: 11), perro (*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).

Como se usa aquí, variantes de las especies se refieren a las variantes en polipéptidos entre las diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamíferos, tales como ratón y humano.

Como se usa aquí, las variantes alélicas se refieren a variaciones en las proteínas entre miembros de la misma especie.

Como se usa aquí, una variante de empalme se refiere a una variante producida por el procesamiento diferencial de la transcripción primaria del ADN genómico que resulta en más de un tipo de mRNA.

Como se usa aquí, un zimogén se refiere a una proteasa que es activada por medio de la ruptura proteolítica, incluyendo ruptura de maduración, tal como ruptura de activación, y/o formación de complejo con otras proteínas y/o cofactores. Un simogén es un precursor inactivo de una enzima proteolítica. Dichos precursores son generalmente más grandes, aunque no más grande necesariamente, que la forma activa. Con referencia a las proteasas de serina, los zimogenes son convertidos en enzimas activas por medio de la ruptura específica, incluyendo ruptura catalítica y autocatalítica, o por medio de la unión de un co-factor de activación, el cual genera una enzima activa. Por ejemplo, generalmente, los zimogenes están presentes en una forma de cadena simple. Los zimogenes, generalmente, están inactivos y pueden ser convertidos en polipéptidos activos maduros por medio de la ruptura catalítica o autocatalítica en uno o más sitios proteolíticos para generar un polipéptido de cadena múltiple, tal como una cadena doble. Un zimogén, por lo tanto, es una proteína enzimáticamente inactiva que es convertida en una

enzima proteolítica por medio de la acción de un activador. La ruptura puede ser llevada a cabo por autoactivación. Una pluralidad de proteínas de coagulación son zimogenes; ellas son inactivas, pero se convierten en rotas y son activadas al inicio del sistema de coagulación seguido del daño vascular. Con referencia a los polipéptidos FVII existen en la plasma sanguínea como zimogenes hasta que se produce la ruptura por aproteasas, tales como por ejemplo, factor IX activado (FIXa), factor X activado (FXa) factor XII activado (FXIIa), trombina, o por autoactivación para producir una forma de cadena doble similar a un zimogén, el cual luego requiere cambio de conformación adicional para la actividad completa.

Como se usa aquí, una proteína o polipéptido "similar a zimogén" se refiere a una proteína que ha sido activada por ruptura proteolítica, pero que todavía presenta propiedades que están asociadas con un zimogén, tal como, por ejemplo, baja o sin actividad, o una conformación que se parece a la conformación de la forma de zimogén de la proteína. Por ejemplo, cuando no se une a un factor de tejido, la forma activada de doble cadena de FVII es una proteína similar a un zimogén; esta retiene una conformación similar al zimogén FVII sin ruptura, y, por lo tanto, presenta muy baja actividad. Con la unión al factor de tejido, la forma activada de doble cadena de FVII sufre un cambio de conformación y adquiere si actividad completa como un factor de coagulación.

Como se usa aquí, una secuencia de activación se refiere a una secuencia de aminoácidos en un zimogén que se encuentra en el sitio requerido para la ruptura de activación o ruptura de maduración para formar

una proteasa activa. La ruptura de una secuencia de activación puede ser catalizada autocatalíticamente o por medio de socios de activación.

Como se usa aquí, la ruptura de activación es un tipo de ruptura de maduración, la cual incluye un cambio de conformación que es requerido para el desarrollo de la actividad enzimática completa. Esta es una vía de activación clásica, por ejemplo, para proteasas de serina en las cuales una ruptura genera una nueva N-terminal que interactúa con las regiones conservadas de la proteasa, tales como Asp194 en quimotripsina, para inducir los cambios conformacionales requeridos para la actividad. La activación puede resultar en la producción de formas de cadena múltiple de las proteasas. En algunos casos, las formas de cadena simple de la proteasa pueden presentar actividad proteolítica.

Como se usa aquí, el "Factor VII activado" o "FVIIa" se refiere a cualquier forma de cadena doble de un polipéptido FVII. Una forma de cadena doble típicamente resulta de la ruptura proteolítica, pero puede ser producida sintéticamente. El Factor VII activado, por lo tanto, incluye la forma de cadena doble similar a zimogén con poca actividad de coagulación, una forma activada completamente (aproximadamente 1000-veces más actividad) que ocurre con la unión al factor de tejido, y las formas mutadas que existen en una forma de cadena doble completamente activada o somete el cambio de conformación a una forma completamente activada. Por ejemplo, una forma de cadena simple de polipéptido FVII (ver, por ejemplo, SEQ ID NO:3) es rota proteolíticamente entre residuos de aminoácidos R152 y I153 del polipéptido FVII maduro. Los

productos de ruptura, cadena pesada de FVII y cadena liviana de FVII, los cuales son mantenidos juntos por medio de unión de disulfuro (entre residuos de aminoácidos 135C y 162C en el FVII de la SEQ ID NO:3), forma la enzima FVII de doble cadena activada. La ruptura proteolítica puede ser llevada a cabo, por ejemplo, por medio de factor IX activado (FIXa), factor X activado (FXa), factor XII activado (FXIIa), trombina, o por autoactivación.

Como se usa aquí, una "propiedad" de un polipéptido FVII se refiere a una propiedad física o estructural, tal como propiedad tridimensional, pI, vida media, conformación y otras características físicas.

Como se usa aquí, una "actividad" de un polipéptido FVII se refiere a cualquier actividad exhibida por un polipéptido de factor VII. Dichas actividades pueden ser probadas *in vitro* y/o *in vivo* e incluyen, pero no se limitan a, coagulación o actividad coagulante, actividad pro-coagulante, actividad proteolítica o catalítica tal como para realizar la activación de factor X (FX) o activación de Factor IX (FIX); antigenicidad (habilidad para unir a o competir con un polipéptido para la unión a un anticuerpo anti-FVII); habilidad para unir factor de tejido, factor X o factor IX; y/o habilidad para unir a fosfolípidos. La actividad puede ser evaluada *in vitro* o *in vivo* utilizando ensayos reconocidos, por ejemplo, por medio de la medición de coagulación *in vitro* o *in vivo*. Los resultados de dichos ensayos indican que un polipéptido exhibe una actividad que puede estar correlacionada a la actividad del polipéptido *in vivo*, en el cual la actividad *in vivo* puede ser referida como actividad biológica. Los ensayos para determinar la funcionalidad o actividad de las formas modificadas de FVII

son conocidos para aquellos versados en la materia. Los ensayos ejemplares para evaluar la actividad de un polipéptido FVII incluyen ensayo de tiempo de protromboplastina (PT) o el ensayo de tiempo de tromboplastina (aPTT) activada parcial para evaluar la actividad coagulantes, o ensayos cromogénicos que usan sustratos sintéticos, tales como los descritos en los ejemplos 4, 5 y 11, para evaluar la actividad catalítica o proteolítica.

Como se usa aquí, "presenta al menos una actividad" o "retiene al menos una actividad" se refiere a la actividad presentada por un polipéptido FVII modificado en comparación con un polipéptido FVII sin modificar de la misma forma y bajo las mismas condiciones. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado en una forma de cadena doble se compara con un polipéptido FVII sin modificar en una forma de cadena doble, bajo las mismas condiciones experimentales, 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 simple es comparado con un polipéptido FVII sin modificar en una forma de cadena simple, 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 presenta al menos una actividad de un polipéptido FVII sin modificar de la misma forma retiene una cantidad suficiente de la actividad de modo tal que, cuando se administra *in vivo*, el polipéptido FVII modificado es terapéuticamente efectivo como un terapéutico pro-coagulante. Generalmente, para que un polipéptido FVII modificado retenga la eficacia terapéutica como un

pro-coagulante, la cantidad de actividad que se retiene es o es aproximadamente 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 más de la actividad de un polipéptido FVII sin modificar de la misma forma que muestra eficacia terapéutica como un pro-coagulante. La cantidad de actividad que se requiere para mantener la eficacia terapéutica como un pro-coagulante puede ser empíricamente determinada, si es necesario. Típicamente, la retención del 0.5% a 20%, 0.5% a 10%, 0.5% a 5% de una actividad es suficiente para retener la eficacia terapéutica como un pro-coagulante *in vivo*.

Se entiende que la actividad que es exhibida o retenida por un polipéptido FVII modificado puede ser cualquier actividad, incluyendo, por no limitado a, coagulación o actividad coagulante, actividad pro-coagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como para llevar a cabo la activación de factor X (FX) o activación de factor IX (FIX); antigenicidad (habilidad para unir a o competir con un polipéptido para la unión a un anticuerpo de anti-FVII); habilidad para unir factor de tejido, factor X o factor IX; y/o habilidad para unir a fosfolípidos. En algunos casos, un polipéptido FVII modificado puede retener una actividad que es aumentada en comparación con un polipéptido FVII sin modificar. En algunos casos, un polipéptido FVII modificado puede retener una actividad que es reducida en comparación con un polipéptido FVII sin modificar. La actividad de un polipéptido FVII modificado puede ser cualquier nivel del porcentaje de actividad del polipéptido sin modificar, 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, polipéptido FVII modificado puede presentar actividad incrementada o reducida comparado con el polipéptido FVII sin modificar en la misma forma. Por ejemplo, este puede retener al menos aproximadamente 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 sin modificar. En otras modalidades, el cambio en actividad es al menos aproximadamente 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 sin modificar. El nivel particular a ser retenido es una función del uso pretendido del polipéptido y puede ser determinada empíricamente. La actividad puede ser medida, por ejemplo, utilizando ensayos *in vitro* o *in vivo* tales como aquellos aquí descritos o en los Ejemplos más adelante.

Como se usa aquí, "actividad de coagulación" o "actividad coagulante" o "actividad pro-coagulante" se refiere a la habilidad de un polipéptido para llevar a cabo la coagulación. Los ensayos para evaluar la actividad coagulante son conocidos por los expertos en la materia, e incluyen ensayo de tiempo de

protromboplastina (PT) o el ensayo de tiempo de tromboplastina (aPTT) parcial activado.

Como se usa aquí, "actividad catalítica" o "actividad proteolítica" con referencia a FVII se refiere a la habilidad de una proteína FVII para catalizar la ruptura proteolítica de un sustrato, y son usadas de forma intercambiable. Los ensayos para evaluar dichas actividades son conocidos en el arte. Por ejemplo, la actividad proteolítica de FVII puede ser medida usando sustratos cromogénicos tales como Espectrozima FVIIa (CH3SO2-D-CHA-But-Arg-pNA), donde la ruptura del sustrato es monitoreada por la absorbencia y la tasa de hidrólisis de sustrato determinada por regresión lineal.

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

Como se usa aquí, 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 es estructuralmente y/o funcionalmente distinto de otras porciones de la molécula y se puede identificar. Por ejemplo, los dominios incluyen aquellas porciones de una cadena de polipéptido que puede formar una estructura independientemente doblada dentro de una proteína hecha de uno o más motivos estructurales y/o que es reconocida en virtud de una actividad funcional, tal como actividad proteolítica. Una actividad puede tener uno, o más de un, dominio distinto. Por ejemplo, un dominio puede ser identificado,

definido o distinguido por homología de la secuencia allí a miembros de familia relacionados, tales como homología a motivos que definen un dominio de proteasa o un dominio Gla. En otro ejemplo, un dominio puede ser distinguido por su función, tal como por actividad proteolítica, o una habilidad para interactuar con una biomolécula, tal como unión de DNA, unión de ligando, y dimerización. Un dominio puede presentar independientemente una función biológica o actividad de modo tal que el dominio independientemente o fusionado a otra molécula puede desempeñar una actividad, tal como, por ejemplo actividad proteolítica o unión de ligando. Un dominio puede ser una secuencia lineal de aminoácidos o una secuencia no lineal de aminoácidos. Varios polipéptidos contienen una pluralidad de dominios. Dichos dominios son conocidos, y pueden ser identificados por aquellos versados en la materia. A manera de ejemplo, se proporcionan las definiciones, pero se entiende que es bien para el experto en la materia reconocer los dominios particulares por nombre. Si se necesita se puede emplear el programa de computador apropiado para identificar los dominios.

Como se usa aquí, 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 de cadena simple, doble y múltiple de cualquiera de estas proteínas. Un dominio de proteasa de una proteína contiene todos las propiedades requisito de esa proteína requeridas para su actividad proteolítica, tales como por ejemplo, el centro catalítico. Con relación al FVII, el dominio de proteasa comparte homología y característica estructural con los dominios de

proteasa de familia quimotripsina/tripsina, incluyendo la triada catalítica. Por ejemplo, en el polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3, el dominio de proteasa corresponde a las posiciones de aminoácido 153 a 392.

Como se usa aquí, un dominio gama-carboxiglutamato (Gla) se refiere a la porción de una proteína, por ejemplo una proteína dependiente de vitamina K, que contiene modificaciones post-translacionales de residuos de glutamato, generalmente la mayoría, pero no todos los residuos de glutamato, por medio de carboxilación dependiente de K para formar Gla. El dominio Gla es responsable por la unión de alta afinidad de iones de calcio y unir a los fosfolípidos cargados negativamente. Típicamente, el dominio Gla empieza en una extremidad N-terminal de la forma madura de proteínas dependientes de vitamina K y termina con un residuo aromático conservado. En un polipéptido FVII maduro el dominio Gla corresponde a las posiciones de aminoácido 1 a 45 de los polipéptidos ejemplares establecidos en la SEQ ID NO:3. Los dominios Gla son bien conocidos y su lugar puede ser identificado en polipéptidos particulares. Los dominios Gla de las varias proteínas dependientes de vitamina K comparten secuencia, homología estructural y funcional, incluyendo la concentración de residuos hidrofóbicos de N-terminal en un parche hidrofóbico que media en la interacción con los fosfolípidos cargados negativamente en la membrana de superficie de la célula. Otros polipéptidos ejemplares que contienen Gla incluyen, pero no se limitan a, FIX, FX, protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína de matriz Gla, proteína 6 específica para detener crecimiento (Gas6), y proteína Z. Los

dominios Gla de estas y otras proteínas ejemplares están establecidos en cualquiera de las SEQ ID NOS: 110-121.

Como se usa aquí, "nativo" o "endógeno" con referencia a un dominio Gla se refiere al dominio Gla que ocurre naturalmente asociado con todo o una parte de un polipéptido que tiene un dominio Gla. Para efectos de este documento, un dominio Gla nativo es con referencia a un polipéptido FVII. Por ejemplo, el dominio Gla nativo de FVII, establecido en la SEQ ID NO:119, corresponde a aminoácidos 1-45 de la secuencia de aminoácidos establecidos en la SEQ ID NO:3.

Como se usa aquí, un dominio Gla heterólogo se refiere al dominio Gla de un polipéptido, a partir de la misma o diferente especie, que no es un dominio Gla de FVII. Los ejemplos de dominios Gla heterólogos son los dominios Gla a partir de polipéptidos que contienen Gla que incluyen, pero no se limitan a, FIX, FX, protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína de matriz Gla, proteína 6 específica para detener crecimiento (Gas6), y proteína Z. Los dominios Gla de estas y otras proteínas ejemplares se establecen en cualquiera de las SEQ ID NOS: 110-118, 120 y 121,

Como se usa aquí, una porción contigua de un dominio Gla se refiere a por lo 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 componen un dominio Gla.

Como se usa aquí, "una porción suficiente de un dominio Gla para llevar a cabo la unión de fosfolípidos" incluye al menos un aminoácido, típicamente,

50

2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15 o más aminoácidos del dominio, pero menos que todos los aminoácidos que componen el dominio así como el polipéptido que contiene dicha porción exhibe unión de fosfolípidos.

Como se usa aquí, "reemplazar" con respecto a un dominio Gla o "intercambio de dominio Gla" se refiere al proceso por el cual el dominio Gla endógeno de una proteína es reemplazado, usando recombinante, sintético 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 a partir de un dominio Gla y regiones adyacentes que son suficientes para retener la actividad de unión de 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 aquí, un factor (EGF-1 o EGF-2) de factor de crecimiento epidérmico (EGF) se refiere a la porción de una proteína que comparte la hemología de secuencia a una porción específica de 30 a 40 aminoácidos de la secuencia de factor de crecimiento epidérmico (EGF). El dominio de EGF incluye seis residuos de cisteína que han sido mostrados (en EGF) para ser involucrados en uniones de disulfuro. La estructura principal de un dominio de EGF es una hoja beta de dos cadenas seguido por un bucle a un hoja de dos cadenas corta de C-terminal. El FVII contiene dos dominios de EGF: EGF-1 y EGF-2. Estos dominios corresponden a posiciones de aminoácidos 46-82, y 87-

128, respectivamente, del polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3.

Como se usa aquí, el "polipéptido sin modificar" o "FVII sin modificar" y variaciones gramáticas de los mismos se refieren a un polipéptido de partida que se selecciona por modificación como acá se proporciona. El polipéptido de partida puede ser una forma de tipo salvaje que ocurre naturalmente de un polipéptido. Adicionalmente, el polipéptido de partida puede ser alterado o mutado, de modo tal que difiere de una isoforma de tipo salvaje nativa pero sin embargo se refiere acá como un polipéptido de partida sin modificar relacionado con los polipéptidos subsecuentemente modificados acá producidos. Así, las proteínas existentes conocidas en el arte que han sido modificadas para tener un aumento o decremento deseado en una actividad o propiedad particular en comparación con una proteína de referencia no modificada que se puede seleccionar y usar como el polipéptido de partida sin modificar. Por ejemplo, una proteína que ha sido modificada a partir de su forma nativa por uno o más aminoácidos simples cambia y posee bien sea un aumento o una disminución en una propiedad deseada, tal como un cambio en un residuo o residuos de aminoácido para alterar la glicosilación, puede ser una proteína objetivo, referida acá como sin modificar, para modificación posterior de la misma o de diferente propiedad. Los polipéptidos FVII modificados ejemplares conocidos en la técnica incluyen cualquier polipéptido FVII descrito en, por ejemplo, Patente de EEUU Nos. 5580560, 6017882, 6693075, 6762286 y 6806063, Publicación de Patente de EE.UU. Nos. 20030100506 y

20040220106 y Publicación de Patente Internacional Nos. WO1988010295, WO200183725, WO2003093465, WO200338162, WO2004083361, WO2004108763, WO2004029090, WO2004029091, WO2004111242 y WO2005123916.

Como se usa aquí, los "polipéptidos de factor VII modificados" y "factor VII modificado" se refiere a un polipéptido FVII que tiene una o más diferencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido FVII sin modificar. Las diferencias de aminoácidos puede ser mutaciones de aminoácidos tales como uno o más reemplazos de aminoácidos (sustituciones), inserciones o eliminaciones de dominios completos, y cualquier combinación de los mismos. Típicamente, un polipéptido FVII modificado tiene una o más modificaciones en la secuencia primaria en comparación con un polipéptido FVII sin modificar. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado acá suministrado 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 sin modificar. Cualquier modificación está contemplada siempre y cuando el polipéptido resultante exhiba al menos una actividad FVII asociada con un polipéptido FVII nativo, tal como, por ejemplo, actividad catalítica, actividad proteolítica, la habilidad de unir TF o la habilidad para unir plaquetas activadas.

Como se usa aquí, "inhibidores de coagulación" se refiere a proteínas o moléculas que actúan para inhibir o prevenir la coagulación o la formación de coágulos. La inhibición o prevención de coagulación puede ser observada *in vivo* o *in vitro*, y puede ser ensayada usando cualquier método conocido en el

arte incluyendo, pero no limitado a, ensayo de tiempo de protromboplastina (PT) o el ensayo de tiempo de tromboplastina (aPTT) parcial activado.

Como se usa aquí, le inhibidor de vía de factor de tejido (TFPI, también relacionado como TFPI-1) es un inhibidor tipo Kunitz que está involucrado en la formación de un complejo inhibidor cuaternario de TF/FVIIa/TFPI/FXa en el cual la actividad del FVIIa es inhibida. TFPI es expresado como dos diferentes formas de precursor seguido por empalme alternativo. Los precursores TFPIα (SEQ ID NO:101) y TFPIβ (SEQ ID NO:103), los cuales son rotos durante la secreción para generar una proteína madura de aminoácido 276 (SEQ ID NO:102) y de aminoácido 223 (SEQ ID NO:104), respectivamente. El TFPI contiene 3 dominios Kunitz, de los cuales el dominio Kunitz-1 es responsable por la unión e inhibición de FVIIa.

Como se usa aquí, TFPI-2 (también conocido como proteína placentaria 5 (PP5) e inhibidor de proteasa de serina asociada a matriz (MSPI)) se refiere a un homólogo de TFPI. La proteína TFPI-2 madura de aminoácido 213 (SEQ ID NO:105) contiene tres dominios tipo Kunitz que exhiben 43%, 35% y 53% de identidad de secuencia primaria con dominios tipo Kunitz TFPI-1 1, 2 y 3, respectivamente. El TFPI-2 juega un papel en la regulación de la digestión y remodelación de extracelular de matriz, y no se considera que sea un factor importante en la vía de coagulación.

Como se usa aquí, antitrombina-III (AT-III) es un inhibidor de proteasa de serina (serpina). La AT-III es sintetizada como una proteína precursora que contiene residuos de aminoácido 464 (SEQ ID NO:122) que es roto durante la

secreción para liberar una antitrombina madura de aminoácido 432 (SEQ ID NO:123).

Como se usa aquí, los cofactores se refieren a proteínas o moléculas que se unen a otras proteínas o moléculas específicas para formar un complejo activo. En algunos ejemplos, la unión a un cofactor es requerida para la actividad proteolítica óptima. Por ejemplo, el factor de tejido /TF) es un cofactor de FVIIa. La unión de FVIIa a TF incluye cambios conformacionales que resultan en actividad proteolítica aumentada de FVIIa para sus sustratos, FV y FIX.

Como se usa aquí, el factor de tejido (TF) se refiere a una glicoproteína de transmembrana de aminoácido 263 (SEQ ID NO:124) que funciona como un cofactor para FVIIa. Esto se expresa constitutivamente por células de músculo liso y fibroblastos, y ayuda a iniciar la coagulación por medio de la unión de FVII y FVIIa cuando estas células entran en contacto con el flujo sanguíneo seguido por la lesión de tejido.

Como se usa aquí, la plaqueta activada se refiere a una plaqueta que ha sido activada por la unión de moléculas tales como colágeno, tromboxano A2, ADP y trombina para someter varios cambios en morfología, fenotipo y función que finalmente promueve la coagulación. Por ejemplo, una plaqueta activada cambia en forma a una forma más amorfa con los dedos de proyección. Las plaqueta activadas también someten una "vuelta" de la membrana célula de modo tal que fosfatidilserina y otros fosfolípidos cargados negativamente que están normalmente presentes en la pared interna de la membrana celular son

translocados hacia la superficie exterior orientada al plasma. Estas membranas de las plaquetas activadas proporcionan las superficie sobre la cual se llevan a cabo varias de las reacciones de la cascada de coagulación. Las plaquetas activadas también secretan vesículas que contienen dichos factores pro-coagulantes como vWF, FV, trombina, ADP y tromboxano A2, y se adhieren entre si para formar un tapón de plaqueta el cual es estabilizado por fibrina para convertirse en un coágulo.

Como se usa aquí, la unión y/o afinidad aumentada para plaquetas activadas, y cualquier variación gramatical de las mismas, se refiere a una habilidad mejorada de un polipéptido o proteína, por ejemplo un polipéptido FVII, para unirse a la superficie de una plaqueta activada, en comparación con un polipéptido o proteína de referencia. Por ejemplo, la habilidad de un polipéptido FVII modificado para unirse a las plaquetas activadas puede ser mayor que la habilidad de un polipéptido FVII sin modificar para unirse a las plaquetas activadas. La unión y/ afinidad de un polipéptido para las plaquetas activadas puede ser incrementar por al 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 en comparación con la unión o afinidad de un polipéptido sin modificar. Los ensayos para determinar la unión y/o afinidad de un polipéptido para las plaquetas activadas son conocidos en el arte. La unión de un polipéptido FVII a plaquetas activadas es mediada a través de la interacción de aminoácidos en el dominio Gla del polipéptido FVII y los fosfolípidos negativamente cargados, tales como fosfatidilserina, sobre la

plaqueta activada. Como tal, los método para ensayar la unión de polipéptidos, tales como polipéptidos FVII, a plaquetas activadas usan membranas y vesiculas que contienen fosfolípidos, tales como fosfatidilserina. Por ejemplo, la habilidad de un polipéptido para unirse a una plaqueta activada se refleja por la habilidad del polipéptido para unirse a vesículas de fosfolípidos, la cual puede ser medida de dispersión de luz.

Como se usa aquí, la unión o afinidad aumentada para fosfolípidos, y cualquier variación gramatical de las mismas, se refiere a una habilidad mejorada de un polipéptido o proteína para unirse a fosfolípidos en comparación con un polipéptido o proteína de referencia. Los fosfolípidos pueden incluir cualquier fosfolípido, pero particularmente incluye fosfatidilserina. La unión y/o afinidad de un polipéptido para fosfolípidos puede ser incrementada por al 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 en comparación con la unión y/o afinidad de un polipéptido no modificado. Los ensayos para determinar la afinidad y/o unión de un polipéptido a fosfolípidos son conocidos en el arte. Por ejemplo, la unión de polipéptido FVII a vesículas de fosfolípidos puede ser determinada por dispersión de luz relativa a 90° hacia la luz incidente. La intensidad de la dispersión de luz con las vesículas de fosfolípidos solas y con las vesículas de fosfolípidos con FVII es medida para determinar la disociación constante. La resonancia de plasma superficial, tal como sobre un instrumento biosensor

BIAcore, también puede ser utilizada para medir la afinidad de los polipéptidos FVII para las membranas de fosfolípidos.

Como se usa aquí, la resistencia aumentada a inhibidores o "resistencia aumentada a TFPI" o "resistencia aumentada a AT-III" se refiere a cualquier cantidad de sensitividad reducida de un polipéptido a los efectos inhibidores de un inhibidor, tal como TFPI o AT-III, en comparación con un polipéptido de referencia, tal como un polipéptido FVII sin modificar. Por ejemplo, TFPI, complejo con FXa, se une al complejo TF/FVIIa. Al hacerlo así, este inhibe la actividad del FVIIa. Así, un polipéptido FVII modificado que reduce o previene la unión de TFPI al complejo TF/FVIIa, y por lo tanto reduce o previene la inhibición mediada por TFPI de la actividad de FVIIa, muestra una resistencia aumentada a TFPI. La resistencia aumentada a un inhibidor, tal como TFPI, puede ser ensayada por medio de la evaluación de la unión de un polipéptido FVII modificado a un inhibidor. La resistencia aumentada a un inhibidor, tal como TFPI, también puede ser ensayada por medio de la medición de la actividad intrínseca o la actividad coagulante de un polipéptido FVII en la presencia de TFPI. Los ensayos para determinar la unión de un polipéptido a un inhibidor, tal como TPFI o AT-III, son conocidos en el arte. Para los inhibidores no covalentes, tales como, por ejemplo, TFPI, se puede medir un k_i. Para inhibidores covalentes, tales como, por ejemplo, AT-III, se puede medir una constante de tasa de segundo orden para la inhibición. Adicionalmente, la resonancia de plasma superficial, tal como en un instrumento de biosensor BIAcore, también puede ser utilizada para medir la unión de polipéptidos FVII a

TFPI, AT-II u otros inhibidores. Sin embargo, para inhibidores covalentes tales como AT-III, sólo se puede medir una tasa usando BIAcore. Los ensayos para determinar el efecto inhibidor de, por ejemplo, TFPI en actividad coagulante de FVII o actividad intrínseca también son conocidos en el arte. Por ejemplo, la habilidad de un polipéptido FVII modificado de romper su sustrato FX en presencia o ausencia de TFPI puede ser medida, y determinar el grado al cual el TFPI inhibe la reacción. Esto puede ser comparado con la habilidad de un polipéptido FVII sin modificar de romper su sustrato FX en presencia o ausencia de TFPI. Un polipéptido modificado que exhibe resistencia aumentada a un inhibidor presenta, 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 sin modificar.

Como se usa aquí, "actividad biológica" se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o las respuestas fisiológicas que resultan con la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica, por lo tanto, abarca los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de dichos compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden ser observadas en sistemas *in vitro* diseñados para probar o usar dichas actividades. Así, para propósitos de este documento una actividad biológica de un polipéptido FVII abarca la actividad coagulante.

Como se usa aquí el término "evaluar", y las variaciones gramaticales del mismo, pretende incluir la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de un polipéptido, y también de obtener un índice, proporción, porcentaje, visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la detección de la ruptura de un sustrato por un polipéptido puede ser por medición directa del producto, o puede ser medida indirectamente determinando la actividad resultante del sustrato roto.

Como se usa aquí, "numeración de quimotripsina" se refiere la numeración de aminoácido de un polipéptido maduro de quimotripsina de la SEQ ID NO:107. La alineación de un dominio de proteasa de otra proteasa, tal como por ejemplo el dominio de proteasa de factor VII, puede ser hecha con quimotripsina. En dicho caso, los aminoácidos del factor VII que corresponden a los aminoácidos de quimotripsina dan la numeración de los aminoácidos de quimotripsina. Las posiciones correspondientes pueden ser determinadas por dicha alineación por un experto en la materia usando alineamientos manuales o mediante el uso de numerosos programas de alineación disponibles (por ejemplo, BLASTP). Las posiciones correspondientes también pueden estar basadas en alineaciones estructurales, por ejemplo por medio del uso de alineamientos simulados en computador de estructura de proteína. La declaración que los aminoácidos de un polipéptido corresponden a aminoácidos en una secuencia divulgada se refiere a aminoácidos identificados en la alineación del polipéptido con la secuencia divulgada para maximizar la

identidad u homología (donde se alinean los aminoácidos conservados) usando un algoritmo estándar de alineación, tal como el algoritmo GAP. Los números de quimotripsina correspondientes de posiciones de aminoácidos 153 a 406 del polipéptido FVII establecido en la SEQ ID NO:3 son proporcionados en la Tabla 1. Las posiciones de aminoácidos relacionadas con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3 están en letra normal, los residuos de aminoácidos en esas posiciones se encuentran en negrita, y los números de quimotripsina correspondientes están en letra cursiva. Por ejemplo, con la alineación del factor VII maduro (SEQ ID NO:3) con quimotripsina madura (SEQ ID NO:107), la isoleucina (I) en la posición de aminoácido 153 en el factor VII da la numeración de quimotripsina de 116. Los aminoácidos subsecuentes son numerados de acuerdo con esto. En un ejemplo, un ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido 210 del factor VII maduro (SEQ ID NO:3) corresponde a la posición de aminoácido E70 con base en la numeración de quimotripsina. Donde existe un residuo en una proteasa, pero no está presente en la quimotripsina, el residuo de aminoácido da una notación de letra. Por ejemplo, los residuos en quimotripsina que son parte de un ciclo con aminoácido 60 basado en numeración de quimotripsina, pero son insertados en la secuencia de factor VII en comparación con la quimotripsina, son referenciados como por ejemplo K60a, 160b, K60c o N60d. Estos residuos corresponden a K197, I198, K199 y N200, respectivamente, por la numeración relativa a la secuencia de factor VII maduro (SEQ ID NO:3).

Tabla 1. Numeración de Quimotripsina de 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
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*
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 aquí, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo los ácidos nucleicos peptídicos (ANP) y sus mezclas. Los ácidos nucleicos puede ser simples o de doble cadena. Al referirse a las sondas o cebadores, que son etiquetadas opcionalmente, tales como con una etiqueta detectable, tal como fluorescente o de radio, se contemplan las moléculas de cadena de simple. Dichas moléculas son típicamente de una longitud tal que su objetivo es estadísticamente único o de bajo número de copias (normalmente menos de 5, por lo general menos de 3) para probar o cebar una librería. En general, una sonda o cebador contiene al

menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria o idéntico a 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 aquí, un péptido se refiere a un polipéptido que es de 2 a 40 aminoácidos en longitud.

Como se usa aquí, los aminoácidos que ocurren en las varias secuencias de aminoácidos acá provistas son identificados de acuerdo con sus abreviaciones conocidas en tres letras o de una letra (Tabla1). Los nucleótidos que ocurren en los varios fragmentos de ácido nucleico son designados con las designaciones estándar de letra sencilla usada en la rutina en el arte.

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

Manteniéndonos con la nomenclatura estándar de polipéptido describa en *J. Biol. Chem.*, 243: 3552-3559 (1969), y adoptada 37 C.F.R. § § 1.821-1.822, las abreviaturas de los residuos de aminoácidos son mostradas en la Tabla 1:

Tabla 2 – Tabla de Correspondencia

SIMBOLO		
1 Letra	3 Letras	**AMINOÁCIDO**
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina

64

29

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
E	Glu	Ácido glutámico
Z	Glx	Glu 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 otro

Se deberá notar que todas las secuencias de residuos de aminoácidos tienen por fórmulas una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de amino término a carboxilo término. Adicionalmente, la frase "residuo de aminoácido" está ampliamente definida para incluir los aminoácidos listados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 2) y amonio ácidos modificados e inusuales, tales como aquellos relacionados en el 37 C.F.R. § § 1.821-1.822, e incorporados acá para referencia. Además, se deberá notar que una línea al comienzo o al final de una secuencia de residuo de aminoácido indica un péptido unido a una secuencia adicional de uno 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 aquí, un "aminoácido hidrofóbico" incluye cualquiera de los aminoácidos determinados para ser hidrofóbicos usando la escala de consenso de hidrofobicidad de Eisenberg. Los ejemplos son los aminoácidos hidrofóbicos que ocurren naturalmente, tales como isoleucina, fenilalanina, valina, leucina, triptofan, metionina, alanina, glicina, cisteína y tirosina (Eisenberg *et al.*, (1982) Faraday Symp. Chem. Soc. 17:109-120). Los aminoácidos hidrofóbicos que no ocurren naturalmente también son incluidos.

Como se usa aquí, un "aminoácido acídico" incluye entre los aminoácidos que ocurren naturalmente residuos de ácido aspártico y de ácido glutámico. Los aminoácidos acídicos que no ocurren naturalmente también son incluidos.

Como se usa aquí, "aminoácidos que ocurren naturalmente" se refiere a los aminoácidos 20 L que ocurren en los polipéptidos.

Como se usa aquí, "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 que ocurren naturalmente indicados en la Tabla 2. Los aminoácidos que no ocurren naturalmente por lo tanto incluyen, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos diferentes a los 20 aminoácidos que ocurren naturalmente e incluyen, pero no se limitan al, los isostereómeros D de aminoácidos. Los ejemplos de los aminoácidos no naturales son conocidos para aquellos expertos en la materia y pueden ser incluidos en un polipéptido factor VII modificado.

Como se usa aquí, una construcción de ADN es una molécula de ADN circula, lineal o de cadena simple o doble que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos en una manera no encontrada en la naturaleza. Las construcciones de ADN existen como un resultado de la manipulación humana, e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

Como se usa aquí, un segmento de ADN es una porción de una molécula de ADN más grande que tiene atributos específicos. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido específico es una porción de una molécula de ADN más larga, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, el cual, cuando se lee desde la dirección 5' o 3', codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.

Como se usa aquí, el término polinucleótido significa un polímero de cadena simple o dobel de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos con base en la lectura del extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se puede aislar de fuentes naturales, que se sintetizan *in vitro*, o elaborados a partir de una combinación de moléculas sintéticas y naturales. La longitud de una molécula de polinucleótido se da acá en términos de nucleótidos (abreviado "nt") o de pares de bases (abreviado "bp"). El término nucleótidos se utiliza para moléculas de cadena simple y doble donde el contexto lo permita. Cuando el término se aplica a las moléculas de doble cadena que se utilizan para denotar la longitud total y se entenderá como equivalente al término pares de base. Será reconocido por los expertos en la materia que las dos hebras de un polinucleótido de doble cadena pueden variar ligeramente en longitud y que

sus extremos puede ser fraccionados; por lo tanto todos los nucleótidos dentro de una molécula de doble cadena de polinucleótidos no pueden estar vinculados. Estos extremos impares, en general, no exceden a 20 nucleótidos de longitud.

Como se usa aquí, "secuencia primaria" se refiere a la secuencia de residuos de aminoácidos en un polipéptido.

Como se usa aquí, "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótido de los ácidos nucleicos. La similitud puede estar basada en el grado de identidad y/o homología de secuencias de residuos y los residuos allí contenidos. Los métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas y ácidos nucleicos son conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, en un método para evaluar la similitud de secuencia, dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos son alineados en una manera que alcanzan un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "Identidad" se refiere a la medida en la cual las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son invariantes. La alineación de las secuencias de aminoácidos, y algunas secuencias de nucleótidos, también puede tener en cuenta las diferencias conservativas y/9 sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservativas son aquellas que preservan las propiedades fisicoquímicas de los residuos involucrados. Las alineaciones pueden ser globales (alineación de las secuencias comparadas sobre la longitud total de las secuencias y que incluyen todos los residuos) o locales (la alineación de

una porción de las secuencias que incluyen únicamente la región o regiones más similares).

Como se usa aquí, los términos "homología" e "identidad" son usados de forma intercambiable, pero homología puede incluir cambios conservativos de aminoácidos. En general para identificar las posiciones correspondientes las secuencias de aminoácidos son alineadas de modo tal que se obtiene el orden más alto de coincidencia (ver, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., y 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. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991 ; Carillo *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math 48*:1073).

Como se usa aquí, "identidad de secuencia" se refiere al número de aminoácidos idénticos (o bases de nucleótidos) en una comparación entre una prueba y un polipéptido o polinucleótido referencia. Los polipéptidos homólogos se refieren al número predeterminado de residuos de aminoácidos idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones conservativas de aminoácidos así como los residuos idénticos. La identidad de secuencia puede ser determinada por medio de programas de algoritmo estándar de alineación usados con penalidades de espacio por defecto establecidas por cada proveedor. Las moléculas homólogas de ácido nucleico se refieren a un

número predeterminado de nucleótidos idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones que no cambian al aminoácido codificado (es decir, "sustituciones silenciosas") así como los residuos idénticos. Las moléculas sustancialmente homólogas de ácido nucleico hibridan típicamente a tirantez moderada o a una alta tirantez todo a lo largo de la longitud del ácido nucleico o a lo largo de al menos aproximadamente 70%, 80% o 90% de la molécula de ácido nucleico de longitud completa de interés. También se contemplan las moléculas de ácido nucleico que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula hibridada de ácido nucleico. (Para la determinación de la homología de proteínas, los aminoácidos conservativos pueden ser alineados así como los aminoácidos idénticos; en este caso, el porcentaje de identidad y el porcentaje de homología varía). Si dos moléculas de ácido nucleico tienen secuencias de nucleótido (o cualquier dos polipéptidos tienen secuencias de aminoácidos) que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% "idénticas" pueden ser determinadas usando algoritmos conocidos de computador tales como el programa "FAST A", usando por ejemplo, los parámetros por defecto como en Pearson *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988) (otros programas incluyen el paquete de programa GCG (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., *et al.*, *J. Molec. Biol.* 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994), y Carillo *et al. SIAM J Applied Math* 48: 1073 (1988)). Por ejemplo, la function BLAST de la base de datos del Centro Nacional para Información de

Biotecnología puede ser utilizada para determinar la identidad. Otros programas disponibles comercialmente o públicamente incluyen el programa DNAStar "MegAlign" (Madison, WI) y el programa "Gap" del Grupo de Computadores Genéticos de Wisconsin (UWG) (Madison WI)). La homología o identidad porcentual de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico puede ser determinada, por ejemplo, por medio de la comparación de información de secuencia usando un programa de computador GAP (por ejemplo, Needleman *et al. 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 alineado (es decir, nucleótidos o aminoácidos) los cuales son similares, divididos por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación urinaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación pesada de Gribskov *et al. Nucl. Acids Res.* 14: 6745 (1986), como se describió por Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, Fundación Nacional de Investigación Biomédica, pp. 353-358 (1979); (2) una penalidad de 3.0 para cada separación y una penalidad adicional de 0.10 para cada símbolo en cada separación; y (3) sin penalidad para separaciones de extremo.

Por lo tanto, como se usa aquí, el término "identidad" representa una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de prueba y una referencia. En un ejemplo no limitante, "al menos 90% idéntico a" se refiere a las

71

identidades porcentuales desde 90% hasta 100% con relación a los polipéptidos de referencia. La identidad a un nivel de 90% o más es indicativa del hecho que, asumiendo para propósitos de ejemplificación una prueba y una longitud de polinucleótido de referencia de 100 aminoácidos son comparados, no más de 10% (es decir, 10 de 100) de los aminoácidos en los polipéptidos de prueba difieren de aquellos de los polipéptidos de referencia. Las comparaciones similares pueden ser hechas entre una prueba y polinucleótidos de referencia. Dichas diferencias pueden ser representadas como mutaciones de punto aleatoriamente distribuidas en la longitud total de una secuencia de aminoácido o pueden ser agrupadas en una o más ubicaciones de la longitud variable hasta el máximo permitido, por ejemplo, 10/100 diferencia de aminoácidos (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias son definidas como sustituciones, inserciones o supresiones de ácido nucleico o aminoácido. En el nivel de homologías o identidades por encima de aproximadamente 85-90%, el resultado debería independiente del programa y los parámetros de separación establecidos; dichos niveles altos de identidad pueden ser evaluados fácilmente, a medida sin depender del software.

Como se usa aquí, también se entiende que los términos "sustancialmente idéntico" o "similar" varían con el contexto como puede ser entendido por aquellos expertos en la materia relevante, pero que aquellos expertos pueden evaluar.

Como se usa aquí, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similitud y/o identidad) para alinear las posiciones correspondientes

72

82

en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Típicamente, se alinean dos o más secuencias que están relacionadas por 50% o más de identidad. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias que son alineadas en posiciones correspondientes y pueden incluir secuencias de alineación derivadas de ARNs, tales como ESTs y otros cADNs, alineados con la secuencia genómica de ADN.

Como se usa aquí, "hibrida específicamente" se refiere al recocido, por medio del emparejamiento de base complementaria, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) a una molécula de ácido nucleico objetivo. Aquellos expertos en la materia son familiares con los parámetros *in vitro* e *in vivo* que afectan la hibridación específica, tal como la longitud y la composición de la molécula particular. Los parámetros particularmente relevantes a hibridación *in vitro* además incluyen recocido y temperatura de lavado, composición de amortiguamiento y la concentración de sal. Las condiciones ejemplares de lavado para remover las moléculas de ácido nucleico no específicamente unidas a una alta tirantez son 0.1x SSPE, 0.1% SDS, 65°C, y a tirantez media son de 0.2 x SSPE, 0.1% SDS, 50°C. Las condiciones equivalentes de tirantez son conocidas en el arte. El experto en la materia 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 aquí, el polipéptido o proteína aislada o purificada o la porción biológicamente activa de la misma es sustancialmente libre de material

celular u otras proteínas contaminantes de la célula de tejido a partir de la cual se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando es sintetizada químicamente. Las preparaciones pueden ser determinadas para ser sustancialmente libres y éstas aparecen libres de impurezas detectables fácilmente como se determina por métodos estándar de análisis, tales como cromatografía de capa delgada (TLC), electroforesis de gel y cromatografía de líquido de alto desempeño (HPLC), utilizadas por aquellos expertos en la materia para evaluar dicha pureza, o suficientemente puro de modo 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 sustancialmente químicamente puros son conocidos por aquellos expertos en la materia. Un compuesto sustancialmente químicamente puro, sin embargo, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En dichos casos, la purificación adicional puede aumentar la actividad específica del compuesto.

El término sustancialmente libre de material celular incluye las preparaciones de proteínas en las cuales la proteína se separa de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de forma recombinante. En una modalidad, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas de proteasa que tienen menos de aproximadamente 30% (por peso seco) de proteínas no proteasa (también referencias como una proteína contaminante), generalmente

74

menor que aproximadamente 20% de proteínas no proteasa o 10% de proteínas no proteasa o menor que aproximadamente 5% de proteínas no proteasa. Cuando la proteína de proteasa o porción activa de la misma es producida de forma recombinante, esta es también sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, medio de cultivo representa menos de, aproximadamente, o igual a 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína de proteasa.

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

Como se usa aquí, la producción por métodos de recombinante por medio del uso de métodos de ADN recombinante se refiere al uso de métodos bien conocidos de biología molecular para expresar las proteínas codificadas por el ADN clonado.

Como se usa aquí, vector (o plásmido) se refiere a los elementos discretos que son usados para introducir ácido nucleico heterólogo en células para la expresión o replicación de los mismos. Los vectores típicamente se permanecen episomal, pero pueden ser diseñados para llevar a cabo la integración de un gen o una porción del mismo en un cromosoma del genoma.

También se contemplan los vectores que son cromosomas ratifícales, tales como cromosomas ratifícales de bacteria, cromosomas artificiales de levadura y cromosomas ratifícales de mamíferos. La selección y el uso de dichos vehículos son bien conocidos por aquellos expertos en la materia.

Como se usa aquí, la expresión se refiere al proceso por el cual el ácido nucleico es transcrito en mARN y traducido en péptidos, polipéptidos, o proteínas. Si el ácido nucleico se deriva del ADN genómico, la expresión puede, si se selecciona una célula huésped u organismo eucariótica apropiado, incluye procesar, tal como el empalme del mARN.

Como se usa aquí, un vector de expresión incluye los vectores capaces de expresar ADN que está vinculado operativamente con las secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de llevar a cabo la expresión de fragmentos de ADN. Dichos segmentos adicionales pueden incluir las secuencias promotoras o terminadoras, y opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un mejorador, una señal de poliandenilación, y similares. Los vectores de expresión son generalmente derivados de ADN plásmido o viral, o pueden contener elementos de ambos. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otros vectores que, con la introducción en una célula huésped apropiada, resultan en la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por aquellos expertos en la materia e incluyen aquellos que son replicables en células eucarióticas y/o

células procarióticas y aquellos que permanecen episomal o aquellos que se integran en el genoma de la célula huésped.

Como se usa aquí, el vector también incluye "vectores de virus" o "vectores virales". Los vectores virales son virus diseñados que están vinculados operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o transportes) los genes exógenos en células.

Como se usa aquí, un adenovirus se refiere a cualquier grupo de virus que contienen ADN que causan conjuntivitis e infecciones de tractor respiratorio superior en humanos.

Como se usa aquí, el ADN desnudo se refiere al ADN libre de histona que puede ser utilizado para vacunas y terapia de genes. El ADN desnudo es el material genético que se pasa de célula en célula durante una transferencia de genes procesada llamada transformación o transfección. En la transformación o transfección, el ADN purificado o desnudo que es tomado por la célula recipiente dará a la célula recipiente una nueva característica o fenotipo.

Como se usa aquí, vinculado operablemente u operativamente cuando se refiere a segmentos de ADN significa que los segmentos son arreglados de modo tal que funcionan en concierto para sus propósitos pretendidos, por ejemplo, la transcripción inicia en el promotor y procede a través del segmento de codificación hacia el terminador.

Como se usa aquí, un agente que modula la actividad de una proteína o expresión de un gen o ácido nucleico reduce o aumenta o altera de otra forma

77

la actividad de la proteína o, en alguna manera, regula arriba o abajo o altera la expresión del ácido nucleico en una célula.

Como se usa aquí, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido vinculado operativamente a un polipéptido diferente. Una proteína quimérica o de fusión acá proporcionada puede incluir uno o más polipéptidos FVII, o una porción de los mismos, y uno o más polipéptido para cualquiera o más señales de control transcripcional/translacional, secuencias de señal, una etiqueta para localización, una etiqueta para purificación, parte de un dominio de una inmunoglobulina G, y/o un agente de orientación. 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, tales como por medio de acoplamiento químico, a través de, por ejemplo, acoplamiento a grupos sulfhídricos, y aquellas producidas por cualquier otro método por el cual se vincula al menos un polipéptido (es decir, FVII) o una porción del mismo, directamente o indirectamente por medio de vinculadores a otro polipéptido.

Como se usa aquí, vinculado operativamente cuando se refiere a una proteína de fusión se refiere a un polipéptido de proteasa y un polipéptido de no proteasa que son fusionados en marco entre si. El polipéptido de no proteasa puede ser fusionado al terminal N o terminal C del polipéptido de proteasa.

Como se usa aquí, un agente de selección, en cualquier porción, tal como una proteína o una porción efectiva de la misma, que proporciona la unión específica a una molécula de superficie de célula, tal como un receptor de superficie de célula, el cual en algunos casos puede internalizar un conjugado atado o una porción del mismo. Un agente de selección también puede ser uno que promueve o facilita, por ejemplo, el aislamiento de afinidad o purificación del conjugado; adjunto del conjugado a una superficie; o detección del conjugado o complejos que contienen el conjugado.

Como se usa aquí, el derivado o análogo de una molécula se refiere a una porción derivada de o una versión modificada de la molécula.

Como se usa aquí, "enfermedad o desorden" 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 caracterizado por los síntomas identificables. Las enfermedades y desórdenes de interés son aquellas que involucran la coagulación, incluyendo aquellas mediadas por las proteínas de coagulación y aquellas en las cuales las proteínas de coagulación juegan un papel en la etiología o patología. Las enfermedades y desórdenes también incluyen aquellas que son causadas por la ausencia de una proteína tal como en hemofilia, y de particular interés son aquellos desórdenes en donde la coagulación no ocurre debido a una deficiencia o defecto en la proteína de coagulación.

Como se usa aquí, "procoagulante" se refiere a cualquier sustancia que promueve la coagulación sanguínea.

Como se usa aquí, "anticoagulante" se refiere a cualquier sustancia inhibe la coagulación sanguínea.

Como se usa aquí, "hemofilia" se refiere a un desorden de sangrado causado por una deficiencia en los factores de coagulación sanguínea. La hemofilia puede ser el resultado, por ejemplo, de la 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 FXI, es una forma más suave y menos común de hemofilia.

Como se usa aquí, "hemofilia congénita" se refiere a tipos de hemofilia que son heredadas. 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 de factor de coagulación, tales como factor VIII y factor IX resultan en las hemofilias congénitas, Hemofilia A y B, respectivamente.

Como se usa aquí, "hemofilia adquirida" se refiere a un tipo de hemofilia que se desarrolla en la adultez a partir de la producción de anticuerpos que inactivan el FVIII.

Como se usa aquí, "desorden de sangrado" se refiere a una condición en la cual el sujeto tiene una habilidad reducida para controlar el sangrado. Los desórdenes de sangrado pueden ser heredados o adquiridos, y pueden resultar

80

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

Como se usa aquí, "desorden de sangrado adquirido" se refiere a los desórdenes de sangrado que resultan de las deficiencias de coagulación causadas por las condiciones tales como enfermedad de hígado, deficiencia de vitamina K, o coumadin (warfarina) u otra terapia anticoagulante.

Como se usa aquí, "tratar" un sujeto que tiene una enfermedad o condición significa que un polipéptido, composición u otro producto suministrado acá es administrado al sujeto.

Como se usa aquí, un agente terapéutico, un régimen terapéutico, radioprotector, o quimioterapéutico significa medicamento convencional y terapias de medicamento, incluyendo vacunas, las cuales son conocidas para aquellos expertos en la materia. Los agentes radioterapéuticos son bien conocidos en el arte.

Como se usa aquí, tratamiento significa cualquier manera en la cual los síntomas de una condición, desorden o enfermedad son mejorados o de otra forma alterado benéficamente. Así el tratamiento abarca profilaxis, terapia y/o cura. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de las composiciones de acá. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de un FVII modificado y composiciones acá proporcionadas.

Como se usa aquí, la mejora de los síntomas de una enfermedad o desorden particular por medio de un tratamiento, tal como por medio de la administración de una composición farmacéutica u otra terapia, se refiere a

cualquier disminución, bien sea permanente o temporal, que dura o que transciende, de los síntomas que pueden ser atribuidos a o asociados con la administración de la composición o de la terapia.

Como se usa aquí, la prevención o profilaxis se refiere a métodos en los cuales el riesgo de desarrollar enfermedad o condición se reduce. La profilaxis incluye la reducción en el riesgo de desarrollar una enfermedad o condición y/o prevención del 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 aquí, una cantidad efectiva de un compuesto o composición para tratar una enfermedad particular en una cantidad que suficiente para mejorar, o en alguna manera reducir los síntomas asociados con la enfermedad. Dicha cantidad puede ser administrada como una dosis simple o puede ser administrada de acuerdo con un régimen, por el cual este sea efectivo. La cantidad puede curar la enfermedad pero, típicamente, es administrada con el fin de mejorar los síntomas de la enfermedad. Típicamente, la administración repetida es requerida para lograr una mejora deseada de los síntomas.

Como se usa aquí, "cantidad terapéuticamente efectiva" o "dosis terapéuticamente efectiva" se refiere a un agente, compuesto, material, o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Una cantidad efectiva es la cantidad de un

agente terapéutico necesario para prevenir, curar, mejorar, arrestar o parcialmente arrestar un síntoma de una enfermedad o desorden.

Como se usa aquí, "paciente" o "sujeto" a ser tratado incluye humanos y/o animales no humanos, incluyendo 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, hamsters y jerbos.

Como se usa aquí, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o entre más elementos. La asociación puede ser espacial o se refiere al uso de dos o más elementos para un propósito común.

Como se usa aquí, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos o compuestos (Por ejemplo, agentes, moduladores, reguladores, etc.). Esta puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, formulaciones acuosas o no acuosas o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa aquí, un "artículo de fabricación" es un producto que está hecho y vendido. Como se usa a lo largo de esta solicitud, el término pretende abarcar los polipéptido de proteasas modificados y los ácidos nucleicos contenidos en los artículos de empaque.

Como se usa aquí, el fluido se refiere a cualquier composición que puede fluir. Los fluidos por tanto abarcan las composiciones que se encuentran en la forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, gel, lociones, cremas y otras composiciones como tal.

Como se usa aquí, un "kit" se refiere a una combinación empacada, que opcionalmente incluye reactivos y otros productos y/o componentes para practicar métodos que usan los elementos de la combinación. Por ejemplo, los kits contienen un polipéptido de proteasa modificado o molécula de ácido nucleico acá suministrado y otro elemento para un propósito incluyendo, pero no limitado a, administración, diagnóstico, y evaluación de una actividad o propiedad biológica. Los kits opcionalmente incluyen instrucciones para su uso.

Como se usa aquí, un anticuerpo incluye fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab, los cuales están compuestos de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada.

Como se usa aquí, un receptor se refiere a una molécula que tiene una afinidad por un ligando particular. Los receptores pueden ser moléculas de ocurrencia natural o sintética. Los receptores también pueden estar relacionados en el arte como anti-ligandos.

Como se usa aquí, un animal incluye cualquier animal, tales como, pero no limitado a: primates incluyendo humanos, gorilas y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves, tales como pollos; rumiantes, tales como cabras, vacas, venado, oveja; ovinos, tales como cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyendo los humanos como el animal contemplado. Las proteasas que acá se suministran son de cualquier fuente, animal, planta, procariótica o de hongos.

Como se usa aquí, la terapia de gen involucra la transferencia de ácido nucleico heterólogo, tales como ADN, en ciertas células, células objetivo, de un

84

mamífero, particularmente un humano, con un desorden o condición para la cual se busca dicha terapia. El ácido nucleico, tal como ADN, se introduce en las células objetivo seleccionadas, bien sea directamente o en un vector u otro vehículo de entrega, en una manera tal que el ácido nucleico heterólogo, tal como el ADN, se expresa y se produce un producto terapéutico allí codificado. Alternativamente, el ácido nucleico heterólogo, tal como el ADN, puede en alguna manera mediar la expresión de ADN que codifica el producto terapéutico, o este puede codificar un producto, tal como un péptido o ARN que en alguna manera media, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. La terapia genética también puede ser utilizada para entregar el ácido nucleico que codifica un producto de gen que reemplaza un gen defectuoso o complementa un producto de gen producido por el mamífero o la célula en la cual este es introducido. El ácido nucleico introducido puede codificar un compuesto terapéutico, tal como una proteasa o proteasa modificada, que no es normalmente producida en el mamífero huésped o que no es producida en cantidades terapéuticamente efectivas o en un tiempo terapéuticamente útil. El ácido nucleico heterólogo, tal como el ADN, que codifica el producto terapéutico puede ser modificado antes de la introducción en las células del huésped afligido con el fin de mejorar o de alguna forma alterar el producto o la expresión del mismo. La terapia genética también puede involucrar la entrega de un inhibidor o represor u otro modulador de expresión de gen.

85

IAA

Como se usa aquí, el ácido nucleico heterólogo es ácido nucleico que no es normalmente producido *in vivo* por la célula en la cual se expresa o que es producido por la célula pero está en una posición o expresado de forma diferente o que media o codifica los mediadores que alteran la expresión del ácido nucleico endógeno, tal como el ADN, por medio de la llevada a cabo de transcripción, traducción, u otro proceso bioquímico regulable. El ácido nucleico heterólogo es generalmente no endógeno a la célula en la cual es introducido, pero ha sido obtenido a partir de otra célula o preparado de forma sintética. El ácido nucleico heterólogo puede ser endógeno, pero es ácido nucleico que está expresado a partir de una posición diferente o alterado en su expresión. Generalmente, aunque no necesariamente, dicho ácido nucleico codifica ARN y proteínas que no son normalmente producidas por la célula o en la misma forma en la célula en la cual se expresa. El ácido nucleico heterólogo, tal como el ADN, también puede ser relacionado como ácido nucleico extranjero, tal como el ADN. Así, el ácido nucleico heterólogo o el ácido nucleico extranjero incluye una molécula de ácido nucleico no presente en la orientación o posición exacta como la molécula de ácido nucleico de la contraparte, tal como el ADN, es encontrada en el genoma. También se puede referir a la molécula de ácido nucleico a partir de otro organismo o especie (es decir, exógeno).

Cualquier ácido nucleico, tal como el ADN, que un experto en la materia reconocería o consideraría como heterólogo o extranjero a la célula en la cual se expresa el ácido nucleico es abarcado acá por el ácido nucleico heterólogo; el ácido nucleico heterólogo incluye ácido nucleico adicionado de forma

86

exógena que también es expresada de forma endógena. Los ejemplos de ácido nucleico heterólogo incluyen, pero no se limitan a, ácido nucleico que codifica las proteínas de marcador rastreable, tales como una proteína que confiere resistencia al medicamento, ácido nucleico que codifica sustancias terapéuticamente efectivas, tales como agentes anticancerígenos, enzimas y hormonas, y ácido nucleico, tal como el ADN, que codifica otros tipos de proteínas, tales como anticuerpos. Los anticuerpos que son codificados por el ácido nucleico heterólogo pueden ser secretados o expresados en la superficie de la célula en la cual el ácido nucleico heterólogo ha sido introducido.

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

Como se usa aquí, la declaración que un polipéptido "consisten esencialmente" de una secuencia de aminoácidos indicada significa que únicamente la porción indicada, o un fragmento de la misma, del polipéptido de longitud completa está presente. El polipéptido puede opcionalmente, y generalmente lo hará, incluir aminoácidos adicionales de otra fuente o pueden ser insertados en otro polipéptido.

87

Como se usa aquí, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente indique lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia al compuesto que comprende "un dominio extracelular" incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

Como se usa aquí, los rangos y cantidades pueden ser expresados como "aproximadamente" un valor o rango particular. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Así, "aproximadamente 5 bases" significa "aproximadamente 5 bases" y también "5 bases".

Como se usa aquí, "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia descrita a renglón seguido ocurre o no, y que la descripción incluye casos donde dicho evento o circunstancia ocurre y casos donde este no ocurre. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo es no sustituido o sustituido.

Como se usa aquí, las abreviaciones para cualquier grupo de protección, aminoácidos y otros compuestos, son, a menos que se indique lo contrario, de acuerdo con su uso común, abreviaciones reconocidas, o el IUPAC-IUB Comisión en Nomenclatura Bioquímica (ver, (1972) Biochem. 11:1726).

B. Información General de Hemostasia

Acá se suministran polipéptidos factor VII (FVII) modificados. Dichos polipéptidos FVII están diseñados para tener actividad coagulante incrementada. De acuerdo con esto, estos polipéptidos tienen una variedad de usos y aplicaciones, por ejemplo, como terapéuticos para modular hemostasia,

88

IA-5

y otros procesos biológicos relacionados. Para apreciar las modificaciones acá suministradas y el uso de dichas moléculas de FVII modificadas, un entendimiento del sistema hemostático y de la cascada de coagulación sanguínea es una ventaja. La siguiente discusión proporcionan dichos antecedentes, preliminares a una discusión de factor VII, y modificaciones del mismo.

La hemostasia es el mecanismo fisiológico que se deriva del sangrado que resulta de una lesión vascular. La hemostasia normal depende de componentes celulares y proteínas de plasma soluble, que involucra una serie de eventos de señalización que finalmente llevan a la formación de un coágulo de sangre. La coagulación es rápidamente iniciada luego de que la lesión ocurre al vaso sanguíneo y las células endoteliales son dañadas. En la fase primaria de la coagulación, las plaquetas son activadas para formar un tapón hemostático en el sitio de la lesión. La hemostasia secundaria continúa involucrando factor de coagulación de plasma, los cuales actúan en una cascada proteolítica que resulta en la formación de filamentos de fibrina que fortalecen el tapón de plaqueta.

Con la lesión del vaso, el flujo de sangre fluye al área lesionada es restringido por la constricción vascular permitiendo a las plaquetas adherirse al colágeno fibrilar recientemente expuesto en el tejido conectivo subendotelial. Esta adhesión depende del factor de von Willebrand (vWF), el cual se une al endotelio dentro de tres segundo después de la lesión, facilitando así la adhesión de la plaqueta y la agregación. La activación de las plaquetas

agregadas resulta en la secreción de una variedad de factores, incluyendo ADP, ATP, tromboxano y serotonina. También se libera la adhesión de moléculas, fribinogen, vWF, trombospondina y fibronectina. Dicha secreción promueve la adhesión y agregación adicional de plaquetas, la activación de plaqueta y la constricción del vaso sanguíneo aumentadas, y la exposición de fosfolípidos aniónicos en la plaqueta de superficie que sirve como plataforma para el ensamble del los complejos de enzima de la coagulación sanguínea. Las plaquetas cambian de forma seguido de la formación de seudopodia, la cual además facilita la agregación a otras plaquetas resultando en un tapón de plaqueta suelto.

Una cascada de coagulación de peptidasas (la cascada de coagulación) se inicia de forma simultánea. La cascada de coagulación involucra una serie de eventos de activación que involucran la ruptura proteolítica. En dicha cascada, una proteína inactiva de una proteasa de serina (también llamada zimogén) se convierte en una proteasa activa por ruptura de una o más uniones de péptidos, lo cual luego sirve como la proteasa de activación para la siguiente molécula de zimogén en la cascada, resultando finalmente en la formación de coágulo por medio de vinculación cruzada de fibrina. Por ejemplo, la cascada genera las moléculas activadas tales como trombina (a partir de la ruptura de protombrina), la cual además activa las plaquetas, y también genera fibrina a partir de la ruptura de fibrinógeno. La fibrina luego forma un polímero de vínculo cruzado alrededor del tapón de plaqueta para estabilizar el coágulo. Con la reparación de la lesión, la fibrina es digerida por el sistema fibrinolítico,

90

los componentes principales de los cuales son plasminógeno y activador plasminógeno de tipo tejido (tPA). Ambas de estas proteínas son incorporadas en la fibrina de polimerización, donde ellas interactúan para generar plasmita, la cual, a su vez, actúa en la fibrina para disolver el coágulo preformado. Durante la formación del coágulo, los inhibidores de factor de coagulación también circulan a través de la sangre para prevenir la formación de coágulo más allá del sitio de la lesión.

La interacción del sistema, a partir de la lesión hasta la formación del coágulo y la fibrinólisis, se describe más adelante.

1. Adhesión y agregación plaquetaria

La coagulación de sangre es aludida activamente bajo condiciones normales. El endotelio vascular soporta la vasodilación, inhibe la adhesión y activación de plaquetas, suprime la coagulación, mejora la ruptura de fibrina y es antiinflamatorio en carácter. Las células vasculares endoteliales secretan moléculas tales como óxido nitroso (NO) y prostacilina, lo cual inhibe la agregación de plaquetas y dilata los vasos sanguíneos. La liberación de estas moléculas activa las ciclases de guanilato soluble (sGC) y la cinasa I de proteína dependiente de cGMP (cGKI) e incrementa los niveles de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), lo cual causa la relajación de los músculos lisos en las paredes de los vasos. Además, las células endoteliales expresan las ADPasas de superficie de célula, tales como CD39, la cual controla la activación agregación de plaquetas por medio de la conversión de ADO liberado de las plaquetas en inhibidores de plaquetas de nucleótido de adenina.

El endotelio también juega un papel 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 receptores de plasminógeno (anexina II) y de la uroquinasa, así como la secreción de los activadores de plasminógeno de tipo tejido y de la uroquinasa, los cuales promueven la amplitud del coágulo. En una capa final de regulación protrombótica, las células endoteliales juegan un papel activo en inhibir la cascada de coagulación por medio de la producción del sulfato de heparan, lo cual aumenta la cinética de la inhibición de la antitrombina III de trombina y de otros factores de coagulación.

Bajo el trauma vascular agudo, sin embargo, los mecanismos vasoconstrictores predominan y el endotelio llega a ser pro-trombótico, procoagulante y pro-inflamatorio en naturaleza. Esto es conseguido por una reducción de agentes dilatadores endoteliales: adenosina, NO y prostaciclina; y la acción directa del ADP, serotonina y tromboxano en las células vasculares de músculo liso para provocar su contracción (Becker, Heindl *et al.* 2000). El principal activador para el cambio en la función endotelial que conduce a la formación de trombo hemostático es la pérdida de la barrera de célula endotelial entre la sangre y los componentes de la matriz extracelular (ECM) (Ruggeri (2002) Nat Med 8:1227 - 1234). Las plaquetas circulantes identifican y discriminan áreas de lesiones endoteliales y se adhieren al endotelio secundario expuesto. Su interacción con los diferentes sustratos trombogénicos y los resultados generados localmente o liberados de agonistas en la activación

92

de plaquetas. Este procedimiento es descrito como que posee dos etapas, 1) adhesión: el atado inicial a una superficie, y 2) agregación: la cohesión de plaqueta-plaqueta (Savage *et al.* (2001) Curr Opin Hematol 8:270 - 276).

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

La adhesión de la plaqueta y la activación subsiguiente se logra cuando el vWF se une por medio de su dominio A1 al GPIb (parte del complejo receptor de glicoproteína de plaqueta GPIb-IX-V). La interacción entre el vWF y el GPIb es regulada por la fuerza de cizallamiento de modo tal que un aumento en los resultados del esfuerzo de cizallamiento en un aumento correspondiente en la afinidad del vWF para el GPIb. La integrina α1β2, también conocida en leucocitos como VLA-2, es el receptor principal del colágeno en plaquetas, y el engrane a través de este receptor genera las señales intracelulares que contribuyen a la activación de plaquetas. La unión a través de α1β2 facilita el engrane del receptor del colágeno de baja afinidad, GP VI. Esto es parte de la superfamilia de la inmunoglobulina y es el receptor que genera las señales intracelulares más potentes para la activación de plaquetas. La activación de

plaquetas resulta en la liberación del difosfato de adenosina (ADP), que se convierte en tromboxano A2.

La activación de plaquetas también resulta en la expresión de la superficie de los receptores de la glicoproteína IIb-IIIa de plaqueta (GP IIb-IIIa), los receptores de GP IIb-IIIa permiten la adherencia de plaquetas entre si (es decir, agregación) en virtud de las moléculas de fibrinógeno que ligan las plaquetas a través de estos receptores. Esto resulta en la formación de un tapón de plaqueta 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 estabilizadora alrededor del tapón de plaqueta.

2. **Cascada de coagulación**

La vía de coagulación es una vía proteolítica donde cada enzima está presente en el plasma como un zimógeno, o forma inactiva. La ruptura 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 son activadas en la reacción de cascada juegan un papel en la formación de coágulo. Las funciones de la vía como una serie de bucles de retroalimentación positiva y negativa la cual controla el procedimiento de activación, donde el objetivo final es producir trombina, lo cual puede luego convertir fibrinógeno soluble en fibrina para formar un coágulo. Los factores en la coagulación son típicamente debido a un número romano, con una minúscula "a" adjunta para indicar una forma activada. La tabla 3 abajo

establece una lista ejemplar de los factores, incluyendo su nombre común, y su papel en la cascada de coagulación. Generalmente, estas proteínas participan en la coagulación de la sangre a través de una o más de las vías intrínseca, extrínseca o común de la coagulación (ver Figura 1). Como se discutirá más adelante, estas vías están interconectadas, y la coagulación de la sangre se cree que ocurre a través de un modelo a base de célula de activación con el factor VII (FVII) siendo el iniciador primario de la coagulación.

Tabla 3

Factores de Coagulación

Factor	Nombre Común	Vía	Característica
I	Fibrinógeno	Ambos	-
II	Protrombina	Ambos	Contiene dominio Gla terminal N
III	Factor de Tejido	Extrínseca	-
IV	Calcio	Ambos	-
V	Proacelerina, factor lábil, globulina aceleradora	Ambos	Cofactor de proteína
VI (Va)	Acelerina	-	(Redundante al factor V)
VII	Proconvertina, cotromboplastina aceleradora de conversión de protrombina de suero (SPCA)	Extrínseca	Endopeptidasa con dominio Gla
VIII	Factor A antihemofílico, globulina antihemofílica (AHG)	Intrínseca	Cofactor de proteína
IX	Factor de navidad, factor B antihemofílico, componente de tromboplastina de plasma (PTC)	Intrínseca	Endopeptidasa con dominio Gla
X	Factor de poder de Stuart	Ambos	Endopeptidasa con dominio Gla
XI	Antecedente de tromboplastina de plasma (PTA)	Intrínseca	Endopeptidasa
XII	Factor de Hageman	Intrínseca	Endopeptidasa
XIII	Protransglutamidasa, factor	Ambos	Transpeptidasa

	estabilizante de fibrina (FSF), fibrinoligasa		

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

La generación de trombina se ha dividido históricamente en tres vías, la intrínseca (que sugiere que todos los componentes del la vía sean intrínsecos al plasma) y la extrínsecas (que sugiere uno o más componentes del la vía sean extrinsecos al plasma) que proporcionan las vías alternativas para la generación del factor X activado (FXa), y la vía común final que resulta en la formación de trombina (Figura 1). Estas vías participan juntas en un procedimiento interconectado e interdependiente para llevar a cabo la coagulación. Un modelo basado en células de coagulación fue desarrollado que describe estas vías (Figura 2) (Hoffman *et al.* (2001) Thromb Haemost 85:958-965). En este modelo, las vías "extrínseca" e "intrínseca" son llevadas a cabo en las diferentes superficies celulares, la célula que tiene factor de tejido (TF) y la plaqueta, respectivamente. El proceso de coagulación se separa en fases características, iniciación, amplificación y propagación, durante las cuales las vías extrínseca e intrínseca funcionan en diferentes etapas para producir la grande ráfaga de trombina requerida para convertir cantidades suficientes de fibrinógeno en fibrina para la formación de coágulos.

a. Iniciación

El FVII se considera para ser el factor de coagulación responsable para iniciar la cascada de la coagulación, en donde la iniciación es dependiente en su interacción con el TF. El TF es una glicoproteína de transmembrana expresada por una variedad de células tales como células de músculo liso,

96

fibroblastos, monocitos, linfocitos, granulocitos, plaquetas y células endoteliales. Las células mieloide y las células endoteliales expresan solamente el TF cuando ellas son estimuladas, por ejemplo por citosinas pro-inflamatorias. Las células de músculo liso y los fibroblastos, sin embargo, expresan el TF constitutivamente. Por consiguiente, una vez que estas células entran en contacto con el flujo sanguíneo seguido a la lesión del tejido, la cascada de la coagulación es iniciada rápidamente por la unión del TF con el factor VII o FVIIa en el plasma.

Como se discute más adelante, 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 de unión de TF, sin embargo, incluso FVIIa tiene características similares a zimógeno y no muestra actividad significativa que es complejado con el TF. Así, el plasma FVII requiere la activación por ruptura proteolítica, y cambio conformacional adicional a través de la interacción con el TF, para actividad completa. Un rango de proteasas, incluyendo los factores IXa, Xa, XIIa, y la trombina, ha sido mostrado que es capaz de la ruptura de FVII *in vitro*, un procedimiento que es acelerado en presencia de TF. El FVIIa solo también puede activar FVII en presencia de TF, un proceso denominado autoactivation. Las pequeñas cantidades de FVIIa en la sangre son probables debido a la activación por FXa y/o FIXa (Wildgoose *et al.* (1992) Blood 80:25 - 28, y Butenas *et al.* (1996) Bioquímica 35:1904-1910). Los complejos de TF/FVIIa pueden así ser formados por la unión directa de FVIIa a TF, o por la unión de FVII a TF y luego la activación subsiguiente de

97

FVII a FVIIa por una proteasa de plasma, tal como FXa, FIXa, FXIIa, o FVIIa por si solos. El complejo de TF/FVIIa permanece anclado a la célula que tiene TF donde ésta activa pequeñas cantidades de FX en FXa en lo que se conoce como la "vía extrínseca" de la coagulación.

El complejo de TF/FVIIa también se rompe en pequeñas cantidades de FIX en FIXa. El FXa se asocia a su cofactor FVa para también formar un complejo en la célula que tiene TF que puede luego convertir protrombina en trombina. La pequeña cantidad de trombina producida es, sin embargo, inadecuada para soportar la formación necesaria de fibrina para la coagulación completa. Adicionalmente, cualquier FXa y de FIXa activo es inhibido en la circulación por la antitrombina III (AT-III) y otras serpinas, las cuales son discutidas más detalladamente abajo. Esto evitaría normalmente la formación de coágulos en la circulación. En presencia de lesión, sin embargo, el daño vascular resulta en la agregación de plaquetas y la activación en este sitio de la formación de trombina, permitiendo de este modo la amplificación de la señal de coagulación.

b. Amplificación

La amplificación ocurre cuando la trombina se une y activa las plaquetas. Las plaquetas activadas liberan FV de sus gránulos alfa, lo cual es activado por la trombina a FVa. La trombina también libera y activan FVIII a partir del complejo de FVIII/vWF en la membrana de la plaqueta, y rompe FXI en FXIa. Estas reacciones generan plaquetas activadas que tienen FVa, FVIIIa y FIXa

78

en su superficie, las cuales establecen la etapa para una ráfaga grande de generación de trombina durante la etapa de la propagación.

c. Propagación

La propagación de la coagulación ocurre en la superficie de una gran cantidad de plaquetas en el sitio de la lesión. Como se describió anteriormente, las plaquetas activadas tienen FXIa, FVIIIa y FVa en su superficie. Es aquí que la vía extrínseca es efectuada. El FXIa activa FIX a FIXa, la cual puede ser luego una con FVIIIa. Este procedimiento, además de las pequeñas cantidades de FIXa que son generadas por la ruptura de FIX por el complejo de TF/FVIIa en la célula que tiene TF, genera una gran cantidad de complejos de FXIa/FVIIIa que alternadamente pueden activa cantidades significativas de FX a FXa. Las moléculas de FXa se unen a FVa para generar los complejos de protrombinasa que activan protrombina a trombina. La trombina actúa en un bucle de realimentación positiva para activar aún más plaquetas e inician otra vez los procedimientos descritos para la fase de amplificación.

Muy pronto, hay números suficientes de plaquetas activadas con los complejos apropiados para generar la ráfaga de trombina que es bastante grande para generar cantidades suficientes de fibrina a partir de fibrinógeno para formar un coágulo hemostático de fibrina. El fibrinógeno es un dímero soluble en plasma que, cuando se rompe por la trombina, libera fibrinopéptido A y fibrinopéptido B. El Fibrinopéptido B es luego roto por la trombina, y los monómeros de la fibrina formados por esta segunda ruptura proteolítica forma espontáneamente un gel insoluble. La fibrina polimerizada es ligada por fuerzas

no covalentes y electrostáticas y es estabilizada por el factor transamidante XIIIa de enzima (FXIIIa), producido por la ruptura de FXIII por la trombina. La trombina también activa TAFI, la cual inhibe la fibrinólisis por medio de la reducción de la generación de plasmina en la superficie del coágulo. Adicionalmente, la trombina sola se incorpora en la estructura del coágulo para estabilización adicional. Estos agregados de fibrina insoluble (coágulos), junto con las plaquetas agregadas (trombos), bloquean el vaso sanguíneo dañado y previenen el sangrado adicional.

3. Regulación de la Coagulación

Durante la coagulación, la cascada es regulada por procedimientos constitutivos y estimulados para inhibir la formación de coágulos adicionales. Existen distintas razones para tales mecanismos reguladores. Primero, la regulación es requerida para limitar la isquemia de tejidos por la formación de coágulos de fibrina. En segundo lugar, la regulación previene expandir la trombosis mediante la localización de la formación de coágulos solamente al sitio de la lesión del tejido.

La regulación es conseguida por los cationes de distintas moléculas inhibitorias. Por ejemplo, la antitrombina III (AT-III) y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) trabajan constitutivamente para inhibir factores en la cascada de coagulación. La AT-III inhibe trombina, FIXa, y FXa, mientras que el TFPI inhibe FXa y el complejo de FVIIa/TF. Un factor adicional, la proteína C, que es estimulada por medio de la activación de plaquetas, regula la coagulación por ruptura proteolítica y la inactivación de FVa y FVIIIa. La

100

proteína S mejora la actividad de la proteína C. Además, otro factor que contribuye a la inhibición de la coagulación es la trombomodulina integral de la proteína de membrana, que es producida por las células endoteliales vascular y sirve como receptor para la trombina. La unión de trombina a trombomodulina inhibe actividades procoagulantes de la trombina y también contribuye a la activación de la proteína C.

La fibrinólisis, la descomposición del coágulo de fibrina, también proporciona un mecanismo para regular la coagulación. Los multímeros entrecruzados de fibrina en un coágulo son quebrados a polipéptidos solubles por plasmina, una serina proteasa. La plasmina puede ser generada de su plasminógeno inactivo del precursor y se recluta al sitio de un coágulo de fibrina en dos modos: por la interacción con el activador de plasminógeno tisular (tPA) en la superficie de un coágulo de fibrina, y por la interacción con el activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA) en una superficie celular. El primer mecanismo parece ser el principal responsable para la disolución de coágulos dentro de los vasos sanguíneos. El segundo, aunque es capaz de mediar la disolución del coágulo, puede jugar un papel principal en la remodelación del tejido, la migración de célula, y la inflamación.

La disolución del coágulo también se regula en dos modos. Primero, la activación de plasmina eficiente y la fibrinólisis ocurren solamente en los complejos formados en la superficie del coágulo o en una membrana celular, mientras que las proteínas libres en la sangre son catalizadores ineficaces y son inactivados rápidamente. Segundo, los activadores de plasminógeno y

plasmina son inactivados por las moléculas tales como inhibidor activador tipo 1 de plasminógeno (PAI-1) y PAI-2 que actúan en los activadores de plasminógeno, y α2-antiplasmina y α2-macroglobulina que inactivan la plasmina. Bajo circunstancias normales, balance oportuno entre la coagulación y la fibrinólisis resulta en la formación eficiente y la limpieza de los coágulos que siguen a la lesión vascular, mientras que evitan simultáneamente episodios indeseados trombóticos o de sangrado.

Un resumen de factores de coagulación ejemplares, cofactores y proteínas reguladoras, y sus actividades, se establecen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Zimógenos y Cofactores de Factor de Coagulación

Nombre del Factor	**Actividad**
Zimógenos de Serina Proteasas	
Factor XII	Une el colágeno expuesto en el sitio de la lesión de pared de vaso, activado por alto MW quininógeno y calicreína
Factor XI	Activado por el factor XIIa
Factor IX	Activado por el factor Xia + Ca^{2+}
Factor VII	Activado por trombina, factor X, factor IXa o factor XIIa + Ca^{2+}, o autoactivación
Factor X	Activado en la superficie de la plaqueta por complejo de tenasa (FIXa/FVIIIa); también activado por el factor VIIa + factor de tejido + Ca^{2+}, o factor VIIa + Ca^{2+}
Factor II	Activado en la superficie de la plaqueta por el complejo de protrombinasa (FXa/FVa)
Cofactores	
Factor VIII	Activado por trombina; el factor VIIIa actúa como cofactor para el factor IXa

	en la activación del factor X
Factor V	Activado por trombina; el factor Va actúa como cofactor para el factor Xa en la activación de protrombina
Factor III (Factor de tejido)	Actúa como cofactor para el factor VIIa
Fibrinógeno	
Factor I (Fibrinógeno)	Ruptura por trombina para formar fibrina
Transglutaminasa	
Factor XIII	Activado por trombina + Ca^{2+}; promueve la vinculación cruzada covalente de fibrina
Reguladoras y otras proteínas	
Factor von Willebrand (vWF)	Actúa como puente entre el complejo GPIb-V-IX y colágeno
Proteína C	Activado por trombina unida a trombomodulina; el Ca degrada los factores VIIIa y Va
Proteína S	Actúa como cofactor de proteína C
Trombomodulina	Proteína de superficie de célula endotelial; une 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 en complejo con TF
Inhibidor de Vía de Factor de Tejido (TFPI)	Une FXa y luego forma una estructura cuaternaria con TF/FVIIa para inhibir la actividad de TF/FVIIIa

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

C. Factor VII (FVII)

El factor VII (FVII) es una glicoproteína de serina proteasa dependiente de vitamina K que se sintetiza en animales, incluyendo mamíferos, como zimógeno de cadena simple en el hígado y se secreta en la corriente sanguínea. Como se describió anteriormente, FVII es la proteasa de coagulación responsable para iniciar la cascada de eventos proteolíticos que

conducen a la generación de trombina y a la deposición de fibrina. Esto es parte de la vía extrínseca, aunque los efectos descendentes de su actividad también impactan grandemente en la vía intrínseca. Este papel integral en la formación de coágulos ha atraído interés significativo en FVII como un objetivo para terapias clínicas anticoagulante y hemostáticas. Por ejemplo, FVII activado recombinante (rFVIIa) se ha desarrollado como un agente hemostático para el uso en sujetos hemofílicos, y sujetos con otras condiciones de de sangrado. Acá se suministran polipéptidos FVII modificados que son diseñados tener actividad de coagulación aumentada con la activación, y que pueden servir como terapéuticos mejorados para tratar las enfermedades y condiciones susceptibles a la terapia del factor VII.

1. **Estructura y organización del FVII**

El gen FVII (F7) humano está localizado en el cromosoma 13 en 13q34 y es 12.8kb de largo con 9 exones. El gen FVII comparte similitud organizacional significativa con los genes que codifican otras proteínas dependientes de vitamina K, tales como protrombina, factor IX, factor X y proteína C. El mARN para FVII somete un empalme alternativo para producir dos transcritos: variante 1 (Acceso de Genbank No. NM_000131, establecido en la SEQ ID NO: 108) y variante 2 (Acceso de Genbank No. NM_019676, establecido en la SEQ ID NO: 109). La variante de transcrito 2, la cual es la forma más abundante en el hígado, no incluye exón 1b y por lo tanto codifica un polipéptido precursor más corto de 444 aminoácidos (isoforma FVII precursor b; SEQ ID NO:2), en comparación con el polipéptido precursor de 466 aminoácidos codificado por la

variante de transcrito 1 (isoforma FVII precurso a; SEQ ID NO:1). Los aminoácidos que no están presentes en el polipéptido de isoforma FVII precursor b corresponden a las posiciones de aminoácido 22 a 43 de la isoforma FVII precursor a. Estos aminoácidos son parte de la secuencia de propéptido, que resulta en una isoforma FVII de propéptido b truncada. Los polipéptidos precursores son hechos de los siguientes segmentos y dominios: un péptido de señal hidrofóbica (aa 1-20 de la SEQ ID NO:1 y 2), un propéptido (aa 21-60 de la SEQ ID NO:1, y aa 21-38 de la SEQ ID NO:2), un dominio Gla (aa 39-83 de la SEQ ID NO:1, y aa 61-105 de la SEQ ID NO:2), un dominio de factor de crecimiento epidérmico tipo B (Similar a EGF 1, aa84-120 de la SEQ ID NO: 1, y aa 106-142 de la SEQ ID NO: 2), un dominio de factor de crecimiento epidérmico tipo A (Similar a EGF 2, aa 125-166 de la SEQ ID NO: 1, y aa 147-188 de la SEQ ID NO: 2), y un dominio de serina proteasa (aa 191-430 de la SEQ ID NO: 1, y aa 213-452 de la SEQ ID NO: 2).

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

105

~~17A~~

El dominio Gla de FVII es una membrana que une un motivo el cual, en presencia de iones de calcio, interactúa con las membranas del fosfolípido que incluyen la fosfatidilserina. El dominio Gla también juega un papel en la unión al cofactor de FVIIa, factor tisular (TF). Complejado con el TF, el dominio Gla de FVIIa es cargado con siete iones de Ca^{2+} los iones, proyecta tres cadenas laterales hidrofóbicas en la dirección de la membrana celular para la interacción con los fosfolípidos en la superficie celular, y tienen contacto significativo con el dominio de la C-terminal del TF. El dominio Gla se conserva entre las proteínas dependientes de vitamina K, tales como protrombina, los factores de coagulación VII, IX y X, las proteínas C, S, y Z. Estas proteínas requieren la vitamina K para la síntesis postranslacional de 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 potenciales sitios de carboxilación y varios de ellos son por lo tanto modificados por medio de carboxilación.

Además del dominio Gla, la proteína madura de FVII también contiene dos dominios similares de EGF. El primer dominio EGF-similar (EGF-similar 1 o EGF1) es un dominio de EGF de unión de calcio, en el cual seis cisteínas de núcleo conservadas forman tres de puentes de disulfuro. El dominio de EGF1 de FVII une únicamente un ion de Ca^{2+} el ion, pero con una afinidad perceptiblemente más alta que la observada con el dominio Gla (Banner *et al.* (1996) Naturaleza 380:41-46). Esta unión de ion de Ca^{2+} promueve la fuerte interacción entre el dominio de EGF1 de FVII y TF (Osterbund *et al.* (2000) Eur

106

J Biochem 267:6204-6211). El segundo dominio EGF-similar (EGF-similar 2 o EGF2) no es un dominio de unión de calcio, sino también formas 3 puentes de disulfuro. Similar a los otros dominios en FVII, el dominio EGF2 interactúa con el TF. También es disulfuro unido junto con el dominio de proteasa, con el cual comparte una interfaz del contacto grande.

Finalmente, el dominio de serina proteasa de FVII es el dominio responsable por la actividad proteolítica de FVIIa. La secuencia de aminoácidos de FVII en su dominio catalítico muestra identidad de alta secuencia y similitud de estructura terciaria con otras serinas proteasa tales como tripsina y quimotripsina (Jin *et al.* (2001) J Mol Biol, 307: 1503-1517). Por ejemplo, estas serinas proteasa comprante una triada catalítica común H57, D102, S195, basado en la enumeración de quimotripsina. Diferente a otras serinas proteasa, sin embargo, la ruptura de FVIIa no es suficiente para completar la conversión del zimógeno a una enzima completamente activa. Por el contrario, como se discutirá más adelante, FVIIa es activada alostéricamente en su función catalítica por medio de la unión de al receptor TF de la superficie celular, lo cual induce un cambio conformacional en el dominio de la proteasa de FVIIa cambiándola de un estado inactivo zimógeno-similar a una enzima catalíticamente activa. Una región del ciclo de hélice entre el sitio de unión del cofactor y el sitio activo (es decir, las posiciones de los residuos de aminoácidos 305-321, correspondientes a los residuos 163-170 basado en la enumeración de quimotripsina) de FVIIa son importantes para el alosterismo y la zimogenicidad de FVIIa (Persson *et al.* (2004) Biochem J., 379: 497-503).

107

197

Esta región está compuesta de una hélice α corta (posiciones 307 a 312 de los residuos de aminoácidos) seguida por un bucle. La porción N-terminal de la hélice forma parte de la interfaz entre el dominio de proteasa y el TF, y contiene un número de residuos que son importantes para la función proteolítica y la unión óptima a TF. Una comparación de la estructura cristalina de FVIIa solo y de FVIIa complejo con TF indica que la hélice α experimenta cambio conformacional significativo cuando FVIIa une TF. La hélice α de FVIIa sola aparece distorsionada, acortada y orientada diferentemente. Esto afecta las estructuras de bucle adyacentes, moviéndolas lejos del sitio activo. En contraste, la hélice α de FVIIa cuando es complejada con el TF se estabiliza, y los bucles circundantes son ubicados más cerca al sitio activo. Esta estabilización es efectuada a través de mecanismos que implican por lo menos la metionina en la posición del aminoácido 306 (residuos de aminoácidos Met^{164} por enumeración de la quimotripsina) de FVII (Pike *et al.* (1999) PNAS 8925-8930).

2. Modificaciones Post-Traslacionales

El polipéptido precursor de FVII (cualquier isoforma del gen del factor VII) es dirigido a la vía secretoria celular por el péptido señal hidrofóbico, el cual inserta en el retículo endoplásmico (ER) para iniciar la translocación a través de la membrana. Mientras la proteína se desplaza a través ER de la membrana, el péptido señal del aminoácido 20 es roto por una peptidasa de señal dentro del lumen del ER, después de lo cual el polipéptido experimenta otras modificaciones post-traslacionales, incluyendo glicosilación N y O,

carboxilación dependiente de vitamina K de ácidos glutámicos N-terminal a ácidos γ-carboxiglutámicos, e hidroxilación de ácido aspártico a ácido β-hidroxiaspártico.

El propéptido proporciona un sitio de unión para un carboxilato dependiente de vitamina K el cual reconoce una hélice α de residuo 10 amfipática en el polipéptido FVII. Después de la unióin, los residuos de ácido glutátmico 10 de carboxilasa γ-carboxilato dentro del dominio Gla del polipéptido FVII, produce residuos γ-carboxiglutámicos en las posiciones E66, E67, E74, E76, E80, E85, E86, E89 y E95 con creación a la secuencia de aminoácido del precursor de FVII establecida en la SEQ ID NO:3. Para la actividad óptima, la molécula de FVII requiere calcio, el cual une el polipéptido y facilita los cambios conformacionales necesitados para la unión de FVIIa con TF y lípidos. El dominio de Gla γ-carboxilatado une siete iones de Ca^{2+} con afinidad variable, lo cual reduce el cambio conformacional que habilita al dominio Gla interactuar con el dominio C-terminal de TF, y también fosfatidilserinas u otros fosfolípidos cargados negativamente en la membrana de la plaqueta.

La glicosilación N-vinculada es llevada a cabo por la transferencia de Glc_3Man_9 (GlcNAc) o dos residuos de asparagina en el polipéptido FVII, en las posiciones que corresponden a los residuos de aminoácido 45 y 262 de la proteína madura (SEQ ID NO:3). La glicosilación O-vinculada ocurre en los residuos de aminoácido 52 y 60 del 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-glicosilatada y el residuo de ácido aspártico β-hidroxilatado están en el dominio EGF-1 de FVII. Estas modificaciones son llevadas a cabo en el ER y el complejo de Golgi antes del procesamiento final del polipéptido en su forma madura.

3. **Procesamiento de FVII**

El polipéptido pro-FVII modificado es transportado a través del lumen de Golgi al compartimiento *trans*-Golgi donde el propéptido es roto por una propeptidasa justo antes de la secreción de la proteína a partir de la célula. PACE/furin (en donde PACE es un acrónimo para Enzima de Ruptura de Aminoácido Básico Emparejado) en una endopeptidasa localizada a la membrana de Golgi que rompe varias proteínas en el lado carboxiterminal del motivo de secuencia Arg-[cualquier residuo]-(Lys o Arg)-Arg. Esta peptidasa rompe las glicoproteínas dependientes de vitamina K tales como el pro-factor IX y polipéptidos pro-vWF (Himmelspach *et al.* (2000) Thromb Research 97; 51-67), liberando el propéptido de la proteína madura. La inclusión de un sitios de reconocimiento PACE/furin apropiado en precursores recombinantes de Factor VII facilita el correcto procesamiento y secreción del polipéptido recombinante (Margaritas *et al.* (2004) Clin Invest 113(7): 1025-1031). PACE/furin, u otra enzima propeptidasa similar subtilizante, responsable por el procesamiento proteolítico de pro-FVII a FVII. Esta puede reconocer y unir al motivo de consenso –Arg-Arg-Arg-Arg- en las posiciones de aminoácido 35-38 de las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:1, y 57-60 de la secuencia

110

establecida en la SEQ ID NO:2, con la ruptura de propéptido y la liberación de la proteína madura para la secreción.

4. Activación de FVII

La gran mayoría de FVII en la sangre se encuentra en la forma de un zimogén inactivado de cadena simple, aunque una pequeña cantidad está presente en una forma activada de cadena doble. La activación de FVII ocurre con la ruptura proteolítica del enlace Arg^{152}-Ile^{153} (posiciones con relación al polipéptido FVII maduro, establecido en la SEQ ID NO:3), dando salida a un polipéptido de cadena doble que contiene una cadena ligera de aminoácido 153 (aproximadamente 20 kDa) vinculada por un puente de disulfuro a una cadena pesada de aminoácido 254 (aproximadamente 30 kDa). La cadena ligera de FVIIa contiene el dominio Gla y dominios EGF-similares, mientras que la cadena pesada contiene la porción catalítica o de serina proteasa de la molécula. La conversión del FVII de cadena simple en FVIIa de cadena doble es mediado mediante la ruptura por FIXa, FXa, FXIIa, trombina, o en una forma autocatalítica por el FVIIa endógeno (Butenas *et al.* (1996) Biochem 35:1904-1910; Nakagaki *et al.* (1991) Biochem 30:10819-10824). La cantidad de rastreo de FVIIa que ocurre en circulación probablemente se presenta de la acción de FXa y FIXa.

Como se discutió anteriormente, la ruptura de FVII de su forma de zimogén a FVIIa no suficiente para la actividad completa. El FVIIa requiere asociación con TF para la actividad completa (Higashi *et al.* (1996) J Biol Chem 271:26569-26574). Debido a este requerimiento, el FVIIa solo ha sido ascrito

con caracterísicas similares a zimogén, visualizando el plegamiento y forma del zimogén, y exhibiendo relativamente baja actividad. Esta característica similar a zimogén del FVIIa en la ausencia de su asociación con TF la hace relativamente resistente a la antitrombina III (AT-III) y otras serpinas, las cuales generalmente actúan principalmente sobre las formas activas de serina proteasa en lugar de la forma de zimogén. Adicionalmente, el TFPI, el inhibidor principal de la actividad de TF/FVIIa, tampoco se une de forma suficiente a la forma no completa "inactiva" de FVIIa.

Con el complejo con TF, el FVIIa se somete a un cambio conformacional que permite la actividad completa de la molécula. Todos los dominios de FVII están involucrados en la interacción con TF, pero los cambios conformacionales que ocurren son localizados al dominio de proteasa de FVIIa. Por ejemplo, los cambios conformacionales que ocurren con la interacción alostérica de FVIIa y TF incluyen la creación de un sustrato extendido macromolecular que une exosita. Este sitio de unión extendido mejora considerablemente la activación proteolítica mediada por FVII del factor X.

La actividad de FVIIa es además incrementada (es decir, un doblez mil) cuando la interacción de FVIIa es con TF expresado en la superficie celular. Esto se debe a que las membranas de fosfolípidos que contienen fosfolípidos cargados negativamente, tales como fosfatidilserina, son un sitio de interacción de otros factores de coagulación dependientes de vitamina K tales como FIX y FX, los cuales se unen por medio de sus dominios Gla. Por lo tanto, la

concentración local de estas proteínas dependientes de vitamina K es alta en la superficie de la célula promoviendo su interacción con el complejo de TF/FVIIa.

5. Función del FVII

Aunque el FVIIa exhibe actividad aumentada seguida a la activación alostérica por TF, existe evidencia que los mecanismos existen en los cuales el FVIIa solo puede iniciar la coagulación. Así, el FVII puede funcionar en una manera dependiente de TF y una manera independiente de TF. Esta última vía puede jugar un papel más pequeño en la hemostasia normal, aunque podría ser significativo cuando es considerado en el contexto de los desórdenes de sangrado, y los tratamientos de los mismos.

a. Actividad de FVIIa dependiente del factor de tejido

El FVII circulante une la TF de superficie de célula y es activado por FIXa, FXa, trombina, o en una forma automática por medio de FVIIa endógeno como se describió anteriormente. Alternativamente, la muy pequeña cantidad de FVIIa circulante puede unir directamente TF. El complejo TF/FVIIa luego une una pequeña fracción de la FX de plasma y el dominio catalítico de FVIIa rompe FX para producir FXa. La trombina es así formada por medio de la vía extrínseca en la superficie de la célula que contiene TF, cuando el FXa se compleja con FVa y activa protrombina a trombina (Figura 3). El FIX también es activado por el complejo TF/FVIIa, suministrando un vínculo a la vía intrínseca que opera en la superficie de la plaqueta activada. Los sistemas de realimentación positiva en la casada de coagulación descrita anteriormente

suministran los medios por los cuales se producen grandes cantidades de trombina, las cuales rompen fibronogen en fibrina para formar un coágulo.

b. Actividad de FVIIa independiente del factor de tejido

Adicional al mecanismo dependiente de TF para la activación de FX a FXa, existe evidencia que el FVIIa también puede activar FX en la ausencia de TF. Las plaquetas activadas desplazan fosfatidilserinas y otros fosfolípidos negativamente cargados a la superficie exterior orientada al plasma (Hemker *et al.* (1983) Blood Cells 9:303-317). Estos proporcionan "receptores" alternos a través de los cuales el FVIIa se puede unir, aunque con una afinidad relativamente baja que es 1000 dobleces menos que la afinidad de unión de FVIIa a TF (Monroe *et al.* (1997) Br J Haematol 99:542-7). Esta interacción es mediada a través de los residuos en el dominio Gla (Harvey *et al.* (2003) 278:8363-8369). El FVIIa luego puede convertir FX a FXa y FIX a FIXa en la superficie activada de plaquea (Hoffman *et al.* (1998) Blood Coagul Fibrinolysis 9:S61-S65). El FXa permanece asociado con la superficie de plaqueta, donde se puede unir con FVa y generar suficiente trombina a partir de protrombina, mientras que el FIXa recientemente formado se ensambla con FVIIa para catalizar la activación de más FX a FXa (Figura 3). La hemostasia en la ausencia de TF puede luego ser lograda por la realimentación positiva y los mecanismos de propagación descritos anteriormente. Se nota, sin embargo, que mientras que la FVIIa puede contribuir al proceso de coagulación en la plaqueta activada, su presencia no es requerida para la generación de trombina en el mecanismo independiente de TF (Figura 3). Así, en la ausencia de FVIII,

tal como en pacientes con hemofilia, existe evidencia que el FVIIa puede iniciar y/o amplificar la generación de trombina a través de su mecanismo secundario, y llevar a cabo la formación de coágulo.

6. FVII como un biofarmacéutico

El FVII funciona para iniciar la coagulación sanguínea. El FVIIa recombinante (NovoSeven®; rFVIIa) es aprobado para el tratamiento de episodios de sangrado o prevención de sangrado en procedimientos quirúrgicos o invasivos en pacientes que tienen hemofilia A o B con inhibidores al Factor VIII o Factor IX, y en pacientes con deficiencia congénita del Factor VII. El NovoSeven® es una preparación genéticamente diseñada y modificada del factor VIIa que es producido en el sistema de expresión de mamíferos usando células de riñón de hámster bebé (BHK). El agente es casi idéntico al factor VIIa derivado de plasma en su estructura y función (Ratko *et al.* (2004), P & T, 29: 712-720).

La administración de FVIIa recombinante (rFVIIa) ha sido mostrado para promover el coágulo sanguíneo en pacientes que sufren de hemofilia, y el tratamiento con dosis de FVIIa ha sido encontrado para ser seguro y bien tolerado en sujetos humanos. Típicamente, el uso de rFVIIa ha sido en pacientes que han desarrollado inhibidores (es decir, aloanticuerpos) al Factor VIII o Factor IX. El uso de rFVIIa como un coagulante ha sido extendido al tratamiento de otros desórdenes de sangrado, por ejemplo trombastenia de Glanzmann; otros eventos asociados con el sangrado extensivo, tales como un resultado de trauma o cirugía concluyen, pero no se limitan a, transplante de

hígado, cirugía de próstata y trauma de hemorragia; coagulopatías neonatales, enfermedad hepática severa; transplante de médula ósea, trombocitopenias y desórdenes de función de las plaquetas; inversión urgente de anticoagulación oral; deficiencias congénitas de factores V, VII, X, y XI; y enfermedad de von Willebrand con inhibidores al factor de von Willebrand.

Una alta dosis de rFVII es requerida para lograr un efecto terapéutico. La dosis y el régimen de dosis requerido para la administración de rFVII varían dependiendo de la indicación clínica. Por ejemplo, la dosis típica de rFVII para episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A o hemofilia B que tienen anticuerpos es 90 µg/kg administrado por inyección intravenosa (IV). Dado que el rFVII tiene una vida media de 2 horas, la repetición de la dosis es requerida. La dosis adicional puede ser dada cada dos horas hasta que la hemostasia sea lograda. El rango de dosis puede ser alterado dependiendo de la severidad de la condición. Por ejemplo, el rango de dosis de 35 – 120 µg/kg ha sido eficaz. También, la dosis y el régimen de dosis pueden variar con otras indicaciones. Por ejemplo, los pacientes con hemofilia A o hemofilia B sometidos a cirugía pueden ser administrados con una dosis inicial de 90 µg/kg inmediatamente antes de la cirugía, con dosis repetida dada cada dos horas durante y seguido a la cirugía. Dependiendo de la severidad de la cirugía y el episodio de sangrado, la infusión de IV de bolo puede continuar cada dos a seis horas hasta que se logre la curación. En pacientes con deficiencia de FVII congénita, el rFVII es típicamente administrado para prevenir el sangrado en la cirugía u

116

RH

otros procedimientos invasivos a 15 – 30 µg/kg cada 4 a 6 horas hasta que se logre la hemostasia.

El mecanismo de acción del rFVIIa para iniciar la hemostasia explica el requerimiento de altas dosis. Los pacientes con hemofilia tienen una fase de iniciación normal de coagulación, donde el complejo TF/FVIIa activa FX a FXa y lleva a la producción de trombina en el sitio de la célula que tiene TF. Después de esto, sin embargo, el proceso de coagulación se rompe a medida que los pacientes con hemofilia carecen de FVIII (hemofilia A) o FIX (hemofilia B), y por lo tanto no son capaces de formar los complejos de FVIIIa/FIXa en la superficie de la plaqueta activada, lo cual normalmente sirve para activar grandes cantidades de FX a FXa en las fases de amplificación y propagación descritas previamente. Debido a la presencia de inhibidores, tales como TFPI y AT-III, el FXa que es producido en la célula que tiene TF seguido a la ruptura por TF/FVIIa no es capaz de difundirse fácilmente entre las superficies celulares. Como resultado, la generación de trombina a alta escala en la superficie de la plaqueta activada no ocurre, y se forma un coágulo.

Existe evidencia que el efecto hemostático de dosis altas de rFVIIa puede ser logradas usando la generación dependiente de TF y/o independiente de TF de FXa por rFVIIa en las plaquetas activadas (Figura 3). La generación de trombina dependiente de TF puede ser maximizada muy rápidamente con la saturación de moléculas de TF con FVIIa endógeno y rFVIIa. En algunos casos, la alta dosis de rFVIIa puede unir las plaquetas activadas y convertir FX a FXa. El FXa asociado a la superficie activa FVa para generar suficiente

trombina para hemostasia. Dado que el rFVII se une a la superficie de plaqueta con baja afinidad, se puede requerir una dosis más alta de rFVII para generación de trombina. La activación de FXa en las plaquetas activadas asegura que la hemostasia mediada por rFVIIa se localiza al sitio de la lesión.

Un medio para lograr la dosis reducida de rFVII puede mejorar su utilidad y eficiencia como un medicamento. Acá se suministrar los polipéptidos FVII modificados. Entre estos se encuentran lo polipéptidos FVII modificados que exhiben resistencia aumentada al TFPI, resistencia aumentada a la AT-III, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media incrementada, actividad catalítica aumentada en la presencia y/o ausencia de TF, y/o unión aumentada a plaquetas activadas. Estos polipéptidos FVII pueden exhibir actividad coagulante incrementada. Los polipéptidos FVII acá suministrados pueden ser utilizados en los tratamientos para iniciar hemostasia en un mecanismo dependiente de TF y/o independiente de TF de modo tal que se produce FXa y se genera trombina.

D. Polipéptidos FVII modificados

Acá se proporcionan polipéptidos FVII modificados. Los polipéptidos FVII exhiben alteraciones en una o más actividades o propiedades en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Las actividades o propiedades que pueden ser alteradas como resultado de la modificación incluyen, pero no se limitan a, coagulación o actividad coagulante; actividad procoagulante; actividad proteolítica o catalítica tales como para afectar la activación de factor X (FX) o activación de Factor IX (FIX); antigenicidad (habilidad para unir o

118

125

competir con un polipéptido para unir a un anticuerpo anti-FVII); habilidad parar unir factor de tejido, factor X o factor IX; habilidad para unirse a la superficie celular de las plaquetas activadas; habilidad para unirse a fosfolípidos; vida media; estructura tridimensional; pI; y/o conformación. Típicamente, los polipéptidos FVII modificados exhiben actividad procoagulante. Acá se proporcionan polipéptidos FVII modificados que exhiben actividad coagulante aumentada con la activación de su forma de zimogén de cadena simple. Dichos polipéptidos FVII modificados pueden ser utilizados en el tratamiento de desórdenes o eventos de sangrado, tales como hemofilias o lesiones, donde los polipéptidos FVII pueden funcionar para promover la coagulación de sangre. Incluidos dentro de dichos polipéptidos FVII modificados están aquellos que tienen resistencia aumentada a inhibidores tales como el inhibidor de vía de factor de tejido (TFPI) y antitrombina III (AT-III), aquellos que tienen actividad catalítica aumentada en la presencia y/o ausencia de TF, aquellos que tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media aumentada y aquellos que tienen unión y/o afinidad aumentada para la superficie de plaqueta. En partícula, dichos polipéptidos FVII modificados pueden ser utilizados en enfermedades o condiciones para suministrar la actividad coagulante mientras que al mismo tiempo pasan por alto los requerimientos para FVIIIa y FIXa. En un ejemplo, los polipéptidos FVII modificados suministrados acá pueden ser utilizados en pacientes hemofílicos que tienen anticuerpos a FVIIIa y FIXa. Así, los polipéptidos FVII modificados acá suministrados ofrecen ventajas que incluyen una disminución en la

cantidad de FVII administrado que es requerido para mantener una concentración suficiente de FVII activo en el suero para la hemostasia. Esto puede llevar a, por ejemplo, dosis más bajas y/o frecuencia de dosis necesaria para lograr efectos biológicos comparables, inicio más rápido de beneficio terapéutico, mejoría más rápida de los episodios de sangrado agudo, comodidad mayor y aceptación por sujetos, y atenuación de efectos secundarios no benéficos.

Las modificaciones en un polipéptido FVII puede ser hecha a cualquier forma de un polipéptido FVII, incluyendo variaciones alélicas y de especies, variantes de empalme, variantes conocidas en el arte, o moléculas híbridas o quiméricas de FVII. Por ejemplo, las modificaciones acá suministradas pueden ser hechas en un polipéptido FVII precursor establecido en las SEQ ID NOS:1 o 2, un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3, cualquier especie, variantes alélicas o de especies 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 establecidos en las SEQ ID NO: 1-3. Las variantes alélicas de FVII incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de aquellos polipéptidos precursores que tienen una secuencia de aminoácidos establecido en cualquiera de las SEQ ID NOS: 18-74. Las variantes de especies ejemplares para la modificación de acá incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de humanos y no humano incluyendo polipéptidos FVII a partir de polipéptidos FVII de vaca, ratón, chimpancé pigmeo, chimpancé, conejo, rata, macaco, cerdo, perro, pez cebra,

120

pez globo, pollo, orangután y gorila, cuyas secuencias se establecen en las SEQ ID NOS: 4-17 respectivamente. Las modificaciones en un polipéptido FVII puede ser hecho a un polipéptido FVII que también contiene otras modificaciones, tales como aquellas descritas en el arte, incluyendo modificaciones de la secuencia primaria y modificaciones no en la secuencia primaria del polipéptido.

La modificación de polipéptidos FVII también incluyen la modificación de polipéptidos que son híbridos de polipéptidos FVII diferentes y también polipéptidos FVII sintéticos preparados de forma recombinante o sintetizado o construido por otros métodos conocidos en el arte con base en la secuencia de polipéptidos conocidos. Por ejemplo, con base en la alineación de FVII con otros miembros de la familia del factor de coagulación, tales como factor IX (FIX) o factor X (FX), los dominios homólogos entre los miembros de familia son fácilmente identificados. Las variantes quiméricas de polipéptidos FVII pueden ser construidas donde uno o más aminoácidos o dominios enteros son reemplazados en la secuencia de aminoácido FVII usando la secuencia de aminoácido del miembro de familia correspondiente. Adicionalmente, los polipéptidos FVII quiméricos incluyen aquellos donde uno o más aminoácidos o dominios enteros son reemplazados en la secuencia de aminoácido FVII de humano usando la secuencia de aminoácido de una especie diferente (ver por ejemplo, Williamson *et al.* (2005) J Thromb Haemost 3:1250-6). Dichas proteínas quiméricas pueden ser utilizadas como el polipéptido FVII inicial no modificado de acá.

Las modificaciones acá suministradas de un polipéptido de referencia no modificado inicial incluye reemplazos de aminoácido o sustitución, adiciones o supresiones de aminoácidos, o cualquier 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 posiciones modificadas. También se suministran acá polipéptidos FVII modificados con dos o más modificaciones en comparación un polipéptido FVII inicial de referencia. 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 posiciones modificadas. Cualquier modificación acá suministrada puede ser combinada con cualquier otra modificación conocida por los expertos en la materia siempre y cuando el polipéptido FVII modificado resultando exhiba actividad de coagulación aumentada cuando se encuentre en su forma de cadena doble o activada. Típicamente, los polipéptidos FVII modificados exhiben actividad coagulante incrementada. Las actividades o propiedades que pueden ser alteradas como resultado de una modificación incluyen, pero no se limitan a, coagulación o actividad coagulante; actividad procoagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como para afectar la activación del factor X (FX) o la activación del Factor IX (FIX); antigenicidad (habilidad para unirse a o competir con un polipéptido para la unión a un anticuerpo anti-FVII); habilidad para unir factor de tejido, factor inhibidor de factor de tejido (TFPI), antitrombina III, factor X o factor IX; habilidad a la superficie de plaquetas activadas; habilidad para unirse a fosfolípidos; vida media de suero; estructura tridimensional; pI; y/o

122

~~122~~

conformación. Incluidos dentro de los polipéptidos FVII modificados acá suministrados se encuentran aquellos que tienen resistencia aumentada al inhibidor de vía de factor de tejido (TFPI), resistencia aumentada a antitrombina III (AT-III), actividad catalítica incrementada en la presencia y/o ausencia de TF, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media de suero aumentada, actividad intrínseca aumentada y/o afinidad aumentada y/o unión para plaquetas activadas.

En algunos ejemplos, una modificación puede afectar dos o más propiedades o actividad de un polipéptido FVII. Por ejemplo, una modificación puede resultar en resistencia aumentada a TFPI y actividad catalítica aumentada del polipéptido FVII modificado en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Los polipéptidos FVII no modificados suministrados acá pueden ser ensayados para cada propiedad y actividad para identificar el rango de efectos de una modificación. Dichos ensayos son conocidos en el arte y descritos más adelante. Los polipéptidos FVII modificados acá suministrados también incluyen polipéptidos FVII que son modificados adicionalmente por maquinaria celular e incluyen, por ejemplo, polipéptidos glicosilatados, γ-carboxilatados y β-hidroxilatados.

Las modificaciones acá proporcionadas a un polipéptido FVII son hechas para aumentar la resistencia TFPI, aumentar la resistencia a AT-III, mejorar las propiedades farmacocinéticas, tales como para aumentar la vida media del suero, aumentar la actividad catalítica en la presencia y/o ausencia de TF y/o aumentar la afinidad y/o unión para las plaquetas activadas. Por ejemplo, un

polipéptido FVII puede incluir modificaciones que aumentan uno o ambos de la resistencia TFPI u la unión a las plaquetas. En otros ejemplos, cualquier modificación acá proporcionada puede ser combinada con cualquier otra modificación conocida para los expertos en la materia siempre y cuando el polipéptido FVII modificado resultante exhiba actividad coagulante aumentada cuando se encuentra en una forma de cadena doble. Típicamente, dicha actividad de coagulación aumentada se desde a la resistencia incrementada a TFPI, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media de suero aumentada, resistencia aumentada a AT-III, glicosilación alterada, actividad catalítica aumentada, y/o unión y/o afinidad aumentada para los fosfolípidos. En algunos ejemplos, las modificaciones que son introducidas en un polipéptido FVII para alterar una actividad o propiedad específica también, o de forma contrario, pueden afectar otra actividad o propiedad. Por lo tanto, las modificaciones acá proporcionadas pueden afectar la propiedad o actividad que fueran diseñadas para afectar y una o más de otras propiedades o actividades. Por ejemplo, las modificaciones hechas a un polipéptido FVII para aumentar la resistencia a TFPI también pueden mejorar las propiedades farmacocinéticas, tales como vida media de suero. En algunos ejemplos, una modificación simple, tal como una sustitución de aminoácido simple, altera 2, 3, 4 o más propiedades o actividades de un polipéptido FVIi. Los polipéptidos FVII modificados acá suministrados pueden ser ensayados por cada propiedad y actividad para identificar el rango de efectos de una modificación. Dichos ensayos son conocidos en el arte y descritos más adelante. Los polipéptido

124

FVII modificados acá proporcionados incluyen polipéptidos FVII que son modificados adicionalmente por la maquinaria celular e incluyen, por ejemplo, polipéptidos glicosilatados, γ-carboxilatados y β-hidroxilatados.

Las modificaciones acá suministradas pueden ser hechas por medio de técnicas de ADN recombinante estándar tales como lo son rutina para un experto en la materia. Cualquier método conocido en el arte para efectuar la mutación de cualquiera o de más aminoácidos en una proteína objetivo puede ser empleado. Los métodos incluyen mutagénesis estándar dirigidas en sitio (utilizando por ejemplo, un kit, tales como kits como QuikChange disponibles de Stratagene) de moléculas de ácido nucleico codificado, o por métodos de síntesis de polipéptido de fase sólida. Adicionalmente, las proteínas quiméricas modificadas acá proporcionadas (es decir, intercambio de dominio Gla) pueden ser generadas por técnicas de rutina de ADN recombinante. Por ejemplo, los polipéptidos quiméricos pueden ser generados usando enzimas de restricción y metodologías de clonación para sub-clonación de rutina de los componentes de polipéptido quimérico deseado.

Otras modificaciones que están o que no están en la secuencia primaria del polipéptido también pueden ser incluidas en un polipéptido FVII modificado, o conjugados de los mismos, incluyendo, por no limitado a, la adición de restos de carbohidrato, la adición de un resto de polietilenglicol (PEG), la adición de un dominio Fc, etc. Por ejemplo, dichas modificaciones adicionales pueden ser hechas para aumentar la estabilidad o vida media de la proteína.

Los polipéptidos FVII modificados resultantes incluyen aquellos que son zimogén de cadena simple o polipéptidos activos o aquellos que son polipéptidos similares a zimogén de cadena simple o de cadena doble. Por ejemplo, cualquier polipéptido modificado acá suministrado que es un polipéptido de zimogén de cadena simple puede ser autoactivado o activado por otros factores de coagulación para generar un FVII modificado que es una forma de cadena doble (es decir, FVIIa). Las actividades de un polipéptido FVII modificado son típicamente exhibidas en su forma de cadena doble.

Los polipéptidos FVII modificados acá suministrados pueden exhibir resistencia a TFPI aumentada, resistencia a AT-II aumentada, actividad catalítica aumentada en la presencia y/o ausencia de TF, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media de suero aumentada, y/o unión y/o afinidad aumentada para los fosfolípidos. Típicamente, dichas propiedades y/o actividades de los polipéptidos FVII modificados acá proporcionados son hechos mientras retienen otras actividades o propiedades de FVII, tales como, pero no limitado a, unión a TF y/O unión y activación a FX. Así, los polipéptidos FVII modificados acá suministrados retienen la unión de TF y/o unión de FX y activación en comparación con una forma de tipo salvaje o de inicio del polipéptido FVII. Típicamente, dicha actividad es sustancialmente no cambiada (menos de 1%, 5%, 10%, 20% o 30· cambiadá) en comparación con una proteína tipo salvaje o de inicio. En otros ejemplos, la actividad de un polipéptido FVII modificado se aumenta o se disminuye en comparación con un polipéptido FVII tipo salvaje o de inicio. La actividad puede ser evaluada *in*

vitro, ex vivo o *in vivo* y puede ser comparada al del polipéptido FVII no modificado, tales como por ejemplo, el polipéptido FVII maduro nativo tipo salvaje (SEQ ID NO:3), el polipéptido FVII precursor de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1 o 2), o cualquier otro polipéptido FVII conocido para aquellos expertos en la materia y usado como el material de inicio.

Así, en virtud de las modificaciones acá suministradas, los polipéptidos FVII modificados pueden exhibir actividad de coagulación aumentada en una forma dependiente de TF y/ independiente de TF. Típicamente, la actividad de coagulación de TF aumentada de los polipéptidos FVII modificados acá suministrados pueden ser observados *in vitro* en ensayos apropiados, o *in vivo*, tales como con la administración a un sujeto, tal como un sujeto humano o no humano. La actividad aumentada de los polipéptidos FVII modificados puede ser mejorada en al 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%, el 300%, el 400%, el 500%, o más en comparación con la actividad del polipéptido FVIIa de inicio o no modificado.

1. **Resistencia aumentada a los inhibidores**

Como la mayoría de los sistemas biológicos, la cascada de coagulación es regulada por los mecanismos positivos o negativos. Estos mecanismos actúan a menudo por la inhibición o mejoramiento de la actividad de uno o más factores involucrados en la cascada, bien sea de forma directa o indirecta.

127

Así, son de interés los factores de coagulación terapéuticos que son resistentes a los mecanismos inhibidores que regulan negativamente su actividad. En particular, son de interés los polipéptidos FVII modificados que son resistentes a las moléculas inhibidores que normalmente exhiben actividad FVII. El regulador primaria del complejo TF/FVIIa es el inhibidor de vía de factor de tejido (TFPI). También es inhibidor a la actividad FVIIa, aunque en una medida menor, la antitrombina III (AT-III).

a. TFPI

El inhibidor de vía de factor de tejido es un polipéptido de cadena simple codificado por 9 exones localizados en el cromosoma 2q31-q32.1. EL TFPI (también relacionado como TFPI-1) es un inhibidor tipo Kunitz que es sintetizado principalmente por células endoteliales y contiene una región terminal de amino cargada negativamente, tres dominios de inhibidor tipo Kunitz tándem y una cola terminal de carboxilo altamente básica (Wuh *et al.* J. Biol. Chem. 263:6001 (1988)). A través del empalme alternativo de mARN, dos formas diferentes de TFPI son generadas: TFPIα y β. TFPIα es una proteína secretada con un peso molecular de aproximadamente 46 kDa. El polipéptido precursor es 304 aminoácidos en longitud (SEQ ID NO:101), y es procesado por la ruptura del péptido de señal de aminoácido 28, resultando en la secreción de una glicoproteína madura de aminoácido 276 (SEQ ID NO:102). La proteína madura contiene 18 residuos de cisteína y forma 9 puentes de disulfuro cuando se dobla correctamente. La secuencia primaria también contiene tres sitios de consenso de glicosilación N-vinculados Asn.X.Ser/Thr,

los residuos de asparagina localizados en las posiciones 145, 195 y 256. Los dominios Kunitz-1 y 2 son responsables por la unión y la inhibición del complejo TF/FVIIa y FXa, respectivamente (ver por ejemplo, Figura 4). El dominio Kunitz-3, el cual carece de actividad inhibidora de proteinasa, y el término C de TFPIα han sido mostrados para estar involucrados en su localización de superficie celular (Piro *et al.* (2004) Circulation 110:3567-3572).

TFPIβ es una forma alternativamente empalmada de TFPI en la cual el dominio Kunitz-3 y la región C-terminal de TFPIα es reemplazada con una región C-terminal no relacionada que dirige la unión de un ancla de glicosilfosfatidilnositol (GPI). El polipéptido precursor (SEQ ID NO:103) es procesado a una proteína madura que es 223 aminoácidos (SEQ ID NO:104). Basado en la masa de proteína, el TFPIβ (28 kDa) es considerablemente más pequeño que el TFPIα (36 kDa). Ambos migran con la misma masa molecualr aparente (46 kDa) en electroforesis de gel de dodecilculfato poliacrilamida de sodio (SDS-PAGE), sugiriendo una diferencia en las modificaciones post-translacionales. Los TFPIα y β son unidos a la superficie de la célula de una forma dependiente de GPI. El TFPIβ contiene un ancla GPI es su término C, considerando que el TFPIα está aparentemente unido a una proteína vinculada a GPI no identificada aún. Aunque el TFPIβ representa únicamente el 20% de la superficie total TFPI, este cuenta para la mayoría de la actividad anti TF/FVIIa, sugiriendo un papel alternativo potencial para la TFPIα de la superficie celular, tal como la unión y el aclaramiento de FXa (Piro *et al.* (2005) J Thromb Haemost 3:2677-2683).

EL TFPI inhibe la cascada de coagulación en al menos dos vías; por medio de la unión al sitio activo de FXa, y por medio de la desactivación del complejo TF/FVIIa (ver por ejemplo, Figura 4). El primer dominio Kunitz se une a FVIIa, mientras que el segundo dominio se una a FXa (Girard *et al.* (1989) Nature 338:518-520). El TFPI libre se une a FVIIa muy lentamente in comparación con su unión de FXa. Una vez está unido a FXa sin embargo, el complejo TFPI/FXa muestra una afinidad fuerte por el complejo TF/FVIIa. Su interacción resulta en la formación de un complejo heterotetramérico en una superficie de célula endotelial en la cual el FVIIa está catalíticamente inactivo (Figura 4). Esta estructura cuaternaria por lo tanto previene la iniciación de TF/FVIIa de la cascada de coagulación.

Al menos otro homólogo de TFPI existe en los humanos, TFPI-2, también conocido como proteína 5 placentaria (PP5) e inhibidor de serina proteasa asociado a matriz (MSPI). El TFPI-2 es un inhibidor de serina proteasa tipo Kunitz asociado a matriz de 32 kDa el cual exhibe actividad inhibidora hacia un amplio espectro de proteinasas, incluyendo tripsina, plasmita, quimotripsina, catepsina G, calicreína de plasma, y el complejo de fator de tejido-factor VIIa. La proteína TFPI-2 madura de aminoácido 213 (SEQ ID NO:105) contiene tres dominios tipo Kunitz que exhiben 43%, 35% y 53% de identidad de secuencia primaria con dominios tipo Kunitz de TFPI 1, 2 y 3, respectivamente. El primer dominio tipo Kunitz de TFPI-2 humando contiene todos los elementos estructurales para la inhibición de la serina proteasa, aunque los estudios cinéticos y moleculares indican que el TFPI-2 e un

inhibidor de plasmita más efectivo que varias serinas proteasas, incluyendo TF/FVIIa (Chand *et al.* (2004) J Biol Chem 279:17500-17507). Se cree que juega un papel importante en la regulación de digestión de matriz extracelular y la remodelación. En este contexto, la síntesis reducida de TFPI-2 ha estado relacionada con numerosos procesos patofisiológicos tales como inflamación, angiogenesis, aterosclerosis, degeneración retinal y crecimiento de tumor o metástasis (Chand *et al.* (2005) Thromb Haemost 94:1122-30). Por lo tanto, mientras que los homólogos a TFPI, el TFPI-2 no se cree que sea un factor importante en la vía de coagulación. La alineación de secuencia de la secuencia de dominio Kunitz-1 de TFPI-1 y TFPI-2 se establece en la Figura 6b.

El inmuno agotamiento del TFPI en un modelo de conejo mejoró la coagulación (Warn-Cramer *et al.* (1993) Arteriosel Thromb 13:1551-1557, Ragni *et al.* (200) Circulation 102:113-117), indicando que la disrupción de la formulación del complejo cuaternario TF/FVIIa-TFPI/FXa puede inhibir la regulación negativa de la iniciación de coagulación. Adicionalmente, la disrupción de la interacción de FVIIa con TFPI puede disminuir el aclaramiento de FVIIa. El aclaramiento reducido puede ser manifestado como vida media aumentada. También, el FVIIa unido al TF de superficie celular puede ser internalizado y degradado sin agotar el TF en la superficie celular. Esta forma de internalización y degradación es aumentada significativamente en la presencia de TFPI/FXa, lo cual forma una un complejo cuaternario con la superficie de célula TF/FVIIa. La internalización y degradación que sigue la

unión es mediada a través de una vía de pozo dependiente de proteína relacionada de receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP) (Iakhiaev *et al.*, (1999) J. Biol. Chem 274:36995-37003). El TFPI también puede ayudar a mediar el aclaramiento FVIIa a través de otros mecanismos, tales como mecanismos de aclaramiento hepático o renal.

Modificaciones para llevar a cabo mayor resistencia a TFPI

Acá se proporcionan polipéptidos FVII modificados que exhiben una resistencia a TFPI aumentada. Dicha resistencia a TFPI puede ser lograda, por ejemplo, por la mutación de uno o más residuos en el FVII involucrado en la interacción y unión con TFPI para reducir o prevenir dicha unión, de este modo haciendo a los polipéptidos FVII modificados resistentes a los efectos naturalmente inhibidores de TFPI con respecto a la iniciación de la coagulación. Cuando se evalúa en un ensayo *in vitro* apropiado, o *in vivo*, tal como seguido a la administración a un sujeto como un procoagulante terapéutico, los polipéptidos FVII modificados resistentes a TFPI pueden mostrar actividad coagulante aumentada en comparación con los polipéptidos no modificados. Entre los mutantes de FVIIa que exhiben resistencia a TFPI aumentada, están los mutantes que tienen vida media aumentada. Por ejemplo, el mutante descrito en el Ejemplo 9 exhibe vida media incrementada.

Acá se suministran polipéptidos FVII modificados que tienen una o dos mutaciones en los residuos de contacto FVII/TFPI o residuos en cercanías a la interfaz de interacción. Dichos residuos de contacto incluyen el residuo de ácido aspártico en la posición 196 (D196, Asp^{196}), el residuo de lisina en la

posición 197 (K197, Lys^{197}), el residuo de lisina en la posición 199 (K199, Lys^{199}), el residuo de treonina en la posición 239 (T239, Thr^{239}), el residuo de arginina en la posición 290 (R290, Arg^{290}), y el residuo de lisina en la posición 341 (K341, Lys^{341}), con la numeración relativa a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3. Cuando se identifican usando numeración de quimotripsina, estos residuos corresponden a D60, K60a, T99, R147 y K192 (Figura 7). Un residuo que se encuentra en cercanías a la interfaz FVII/TFPI, y el cual puede ser modificado para causar el obstáculo estérico, es el residuo de glicina en la posición 237 (G237, Gly^{237}) por medio de la numeración de FVII maduro, el cual corresponde a G97 (Gly^{97}) mediante la numeración de quimotripsina.

Los residuos identificados pueden ser modificados tal como por reemplazo de aminoácido, supresión o sustitución. Alternativamente, las inserciones de aminoácidos pueden ser utilizadas para alterar la conformación de un residuo de aminoácido objetivo o la estructura de proteína en la vecindad de un residuo de aminoácido objetivo. Por ejemplo, los residuos identificados pueden ser reemplazados o sustituidos con otro aminoácido con el fin de perturbar la interacción entre FVII y TFPI e inhibir la unión eficiente de las dos proteínas, generando así un polipéptido FVII modificado resistente a TFPI. Por ejemplo, la sustitución de un aminoácido que obstaculiza estéricamente la interacción de FVII y TFPI es contemplado (es decir, sustitución de Gly^{237} (Gly^{97}) con otro aminoácido más grande). En otras modalidades, los polipéptidos FVII modificados resistentes a TFPI pueden ser generados por el

reemplazo de un residuo de contacto con un aminoácido alterno de modo tal que inversión de carga o neutralización de carga es lograda en la posición identificada. Estos tipos de mutaciones pueden afectar significativamente las contribuciones electrostáticas del aminoácido FVII sustituido y perturbar la interacción normal del residuo de contacto con los residuos de contacto de TFPI correspondientes. Por ejemplo, un residuo de ácido aspártico cargado negativamente en FVII, el cual puede interactuar normalmente de forma favorable con un residuo de arginina cargado positivamente en TFPI, puede ser reemplazado con una lisina cargada positivamente para no sólo eliminar la interacción electrostática favorable original sino también para crear una fuerza repulsiva entre los residuos e interferir con la unión eficiente de las proteínas. Esta mutación, por lo tanto, interfiere con la unión eficiente de las proteínas. Así, un aminoácido cargado negativamente (es decir, un aminoácido acídico) tal como ácido aspártico (Asp, D) o ácido glutámico (Glu, E) puede ser sustituido con un aminoácido cargado positivamente (es decir, un aminoácido básico) tal como lisina (Lys, K), arginina (Arg, R), o histidina (His, H). Por el contrario, un aminoácido básico tal como lisina (Lys, K), arginina (Arg, R), o histidina (His, H) puede ser sustituido con un aminoácido acídico, tal como ácido aspártico (Asp, D) o ácido glutámico (Glu, E). También, cualquier residuo de contacto puede ser sustituido con un aminoácido neutro tal como alanina (Ala, A), tirosina (Tyr, Y), metionina (Met, M) o leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), valina (Val, V), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P) o glicina (Gly, G), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), asparagina (Asn, N), glutamina (Gln, Q), triptófano

(Trp, W) y cisteína (Cys, C). Ejemplos de aminoácidos neutros son aminoácidos hidrofóbicos, los cuales incluyen isoleucina (Ile, I), fenilalanina (Phe, F), valina (Val, V), leucina (Leu, L), triptófano (Trp, W), metionina (Met, M), alanina (Ala, A), glicina (Gly, G), cisteína (Cys, C) y tirosina (Tyr, Y).

En lagunas modalidades, la glicina en la posición 237 por numeración de FVII maduro es reemplazada de modo tal que el nuevo aminoácido causa el obstáculo estérico e inhibe la interacción entre FVII y TFPI. La glicina es la más pequeña y la más simple de los aminoácidos, conteniendo sólo un átomo de hidrógeno simple en su cadena lateral. Debido a su pequeño tamaño, la glicina puede encajar en pequeños lugares y puede adoptar conformaciones particulares que otros aminoácidos no pueden. La sustitución de la glicina en la posición 237 con un aminoácido con una cadena lateral más grande podría causar el obstáculo estérico con otros aminoácidos en la proteína FVII, alterando así la conformación de la interfaz de unión de TFPI, y/o causar el obstáculo estérico con aminoácidos en la proteína TFPI. Ambas situaciones podrían resultar en interacción y unión deteriorada de FVII y TFPI, incrementado así la resistencia del polipéptido FVII modificado a los efectos inhibitorios del TFPI. Cualquiera de los 19 aminoácidos naturales contiene cadenas laterales más grandes que la glicina, y pueden ser utilizados para modificar el polipéptido FVII. Los ejemplos de estos son triptófano (Trp, W), isoleucina (Ile, I), valina (Val, V) y treonina (Thr, T).

En otros ejemplos, las inserciones de aminoácidos son incorporadas en el polipéptido FVII cerca de los residuos identificados para interferir con la

interacción entre TFPI y FVII. Uno o más residuos de aminoácidos pueden ser insertados en una o más posiciones en el polipéptido FVII. Por ejemplo, un residuo de tirosina puede ser insertado entre D196 y K197 (correspondiente a D60 y K60a, respectivamente, mediante la numeración de quimotripsina). Esta modificación es D196K197insY (es decir, D196 y K197 son las posiciones entre las cuales una tirosina ha sido insertada (insY)). En otro ejemplo, dos residuos de aminoácidos son insertados en una posición identificada ya que es importante para la interacción con el TFPI. Por ejemplo, una alanina y una serina puede ser insertada entre G237 y T238 (correspondiente a G97 y T98, respectivamente, mediante numeración de quimotripsina), resultando en la modificación G237T238insAS. Dichas mutaciones de inserción podrían resultar en la interacción y unión deterioradas de FVII y TFPI, incrementando así la resistencia del polipéptido FVII modificado a los efectos inhibitorios del TFPI.

La Tabla 5 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares en los residuos identificados, correspondientes a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FVII maduro como se establece en la SEQ ID NO:3. Como se nota, dichos polipéptidos FVII son diseñados para aumentar la resistencia a TFPI mediante la inhibición de la unión FVII/TFPI, y por lo tanto tienen actividad coagulante aumentada. Con referencia a dichas mutaciones, el primer aminoácido (abreviación de una letra) corresponde al aminoácido que es reemplazado, el número corresponde a la posición en la secuencia de polipéptido FVII maduro con referencia a la SEQ ID NO:3, y el segundo aminoácido (abreviación de una letra) corresponde al aminoácido

seleccionado que reemplaza el primer aminoácido en esa posición. Las posiciones de aminoácidos para la mutación también son relacionadas por el esquema de numeración de quimotripsina. En la Tabla 5, el identificador de secuencia (SEQ ID NO) es identificado en el cual las secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido FVII modificado son establecidas, y también cualquier número de identificación de polipéptido.

Tabla 5

Modificación – numeración de FVII maduro	Modificación – numeración de quimotripsina	Número ID de Polipéptido	SEQ ID NO
D196K	D60K	CB554	18
D196R	D60R	CB555	19
D196A	D60A	CB556	20
D196Y	D60Y	CB601	125
D196F	D60F	CB600	126
D196W	D60W	CB602	127
D196L	D60L	CB603	128
D196I	D60I	CB604	129
K197Y	K60aY	CB561	21
K197A	K60aA	CB559	22
K197E	K60aE	CB558	23
K197D	K60aD	CB557	24
K197L	K60aL	CB560	25
K197M	K60aM	CB599	26
K197I	K60aI	CB595	130
K197V	K60aV	CB596	131
K197F	K60aF	CB597	132
K197W	K60aW	CB598	133
K199A	K60cA	CB564	27
K199D	K60cD	CB562	28
K199E	K60cE	CB563	29
G237W	G97W	CB605	134
G237T	G97T	CB606	135
G237I	G97I	CB607	136
G237V	G97V	CB608	137
T239A	T99A	CB565	30
R290A	R147A	CB568	31
R290E	R147E	CB567	32

137

R290D	R147D	CB566	33
R290N	R147N	CB697	206
R290Q	R147Q	CB698	207
R290K	R147K	CB699	208
R290M	R147M	CB700	209
R290V	R147V	CB701	210
K341E	K192E		34
K341R	K192R	CB569	35
K341Q	K192Q	CB609	138
K341N	K192N	CB733	211
K341M	K192M	CB734	212
K341D	K192D	CB735	213
G237T238insA	G97T98insA	CB853	214
G237T238insS	G97T98insS	CB854	215
G237T238insV	G97T98insV	CB855	216
G237T238insAS	G97T98insAS	CB856	217
G237T238insSA	G97T98insSA	CB857	218
D196K197insK	D60K60ainsK	CB858	219
D196K197insR	D60K60ainsR	CB859	220
D196K197insY	D60K60ainsY	CB860	221
D196K197insW	D60K60ainsW	CB861	222
D196K197insA	D60K60ainsA	CB862	223
D196K197insM	D60K60ainsM	CB863	224
K197I198insE	K60al60binsE	CB864	225
K197I198insY	K60al60binsY	CB865	226
K197I198insA	K60al60binsA	CB866	227
K197I198insS	K60al60binsS	CB867	228

En una modalidad adicional, los mutantes de combinación pueden ser generados. Incluidos entre dichos mutantes de combinación están aquellos que tienen dos o más mutaciones de los residuos D196, K197, K199, G237, T239, R290 o K341 con base en la numeración de un FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3 (correspondiente a D60, K60a, K60c, K97, T99, R147 y K192, respectivamente, con base en la numeración de quimotripsina). Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede poseer sustituciones de aminoácido en 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de las posiciones identificadas. Como se notó anteriormente, los

residuos son reemplazados de modo tal que las interacciones favorables entre FVIIa y TFPI son eliminadas, y las interacciones no favorables son introducidas, o el obstáculo estérico es introducido, en una o más posiciones. Así, un polipéptido modificado puede mostrar 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 mutaciones que proporcionan uno o más obstáculos estéricos, inversión de cambio, neutralización de cambio, u otra interacción no favorable, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, dos o más mutaciones pueden ser hechas por lo tanto los aminoácidos cargados negativamente tales como ácido aspártico (asp, D) o ácido glutámico (Glu, E) puede ser sustituido con un aminoácido cargado positivamente tal como lisina (Lys, K), arginina (Arg, R), o histidina (His, H), o viceversa, o sustituciones neutras pueden ser hechas por medio del reemplazo de cualquier aminoácido con, por ejemplo, alanina (Ala, A), tirosina (Tyr, Y), metionina (Met, M) o leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), valina (Val, V), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P) o glicina (Gly, G), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), asparagina (Asn, N), glutamina (Gln, Q), triptófano (Trp, W) y cisteína (Cys, C) o cualquier combinación de las mismas. Ejemplos de aminoácidos neutros son aminoácidos hidrofóbicos, los cuales incluyen isoleucina (Ile, I), fenilalanina (Phe, F), valina (Val, V), leucina (Leu, L), triptófano (Trp, W), metionina (Met, M), alanina (Ala, A), glicina (Gly, G), cisteína (Cys, C) y tirosina (Tyr, Y). En otro ejemplo, doso más mutaciones pueden ser hechas donde al menos una es una inversión de carga o neutralización de carga y otra es una sustitución que reemplaza glicina con aminoácidos que contienen una cadena lateral más grande, tal como triptófano (Trp, W), isoleucina (Ile, I), valina (Val,

V) y treonina (Thr, T). En otros ejemplos, una mutación de inserción puede ser incluida en el polipéptido FVII modificado con otras mutaciones de inserción, o con una o más sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos que introducen interacciones no favorables o obstáculo estérico entre FVII y TFPI. Cualquier permutación de combinaciones puede ser incluida en un polipéptido FVII modificado usando las modificaciones establecidas en la Tabla 5. Por ejemplo, los polipéptidos FVII acá suministrados pueden contener D196K y una o más modificaciones de reemplazos adicionales en la posición de aminoácido D196, K197 y/o G237. Un experto en la materia puede fácilmente generar todas las posibles combinaciones usando las modificaciones establecidas en la Tabla 5.

Por ejemplo, las variantes de FVII incluyen aquellas que incluyen como una de sus mutaciones una sustitución de aminoácido en la posición 197, con base en la numeración de un FVII maduro establecida en la SEQ ID NO:3. Cualquier residuo de aminoácido puede ser sustituido por el residuo de lisina que ocupa la posición 197 en un polipéptido FVII no modificado. En algunas modalidades, la lisina es reemplazada por residuo de una tirosina (Y), una alanina (A), un ácido glutámico (E), un ácido aspártico (D), una leucina (L), una metionina (M), una isoleucina (I), una valina (V), una fenilalanina (F) o un triptófano. Por ejemplo, un ejemplo de un polipéptido FVII modificado es aquel que contiene la sustitución K197L o K197E. En otro ejemplo, un polipéptido FVII que contiene una modificación en la posición 197 (tal como un reemplazo, supresión o adición) también puede incluir otra modificación en otra posición.

140

Generalmente dicha otra modificación está en una posición que es contemplara para modular la interacción de FVII con TFPI, tal como mediante la remoción de una interacción favorable, creación de una interacción no favorable, introducción de un obstáculo estérico, o una combinación de los mismos. Incluidas dentro de dichas modificaciones adicionales están las modificaciones en las posiciones de aminoácido que corresponden a D196, K199, G237, T239, R290 o K341, tal como se describió anteriormente. Otras modificaciones adicionales conocidas en el arte, tal como se describen más adelante, también están contempladas. Así, adicional a la modificación en la posición 197, un polipéptido FVII puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más modificaciones de aminoácido. Por ejemplo, las variantes de FVII ejemplares que tienen al menos una modificación en la posición 197 incluyen aquellas que contienen 2 sustituciones, tales como D196F y K197E, aquellas que contienen 4 sustituciones, tales como D196R, K197E, K199E y R290E, aquellas que contienen 5 sustituciones, tales como K197L, K199D, G237T, R290D y K341Q, aquellas que contienen 6 sustituciones, tales como D196F, K197L, K199E, G237V, T239A y R290D, y aquellas que contienen 7 sustituciones, tales como D196Y, K197L, K199A, G237T, T239A, R290D y K341R. Los mutantes de combinación de FVII ejemplares que incluyen como una de sus mutaciones una sustitución de aminoácido en la posición 197, con base en la numeración de un FVII maduro establecidas en la SEQ ID NO:3, están incluidas en la Tabla 6.

Los polipéptidos FVII ejemplares que contienen dos o más reemplazos de aminoácido en uno o más residuos de aminoácido de D196, K197, K199,

G237, T239, R290 o K341, correspondientes a las posiciones de aminoácido de un polipéptido FVII maduro como se establecen en la SEQ ID NO:3, son aquellas suministradas en la Tabla 6. En la tabla, las posiciones de aminoácido para la mutación también se relacionan por el esquema de numeración de quimotripsina. Dichas modificaciones son diseñadas para aumentar la resistencia a TFPI por medio de la inhibición de la unión de FVII a TFPI, y por lo tanto mejoran la actividad de coagulación.

Tabla 6

Modificación – numeración de FVII maduro	Modificación – numeración de quimotripsina	Número ID de Poli-péptido	SEQ ID NO
D196R/R290E	D60R/R147E	CB579	36
D196K/R290E	D60K/R147E	CB580	37
D196R/R290D	D60R/R147D	CB581	38
D196R/ K197E/ K199E	D60R/K60aE/K60cE	CB586	39
D196K/ K197E/ K199E	D60K/K60aE/K60cE	CB587	40
D196R/ K197E/K199E/ R290E	D60R/K60aE/K60cE/ R147E	CB588	41
D196R/ K197M/ K199E	D60R/K60aM/K60cE	CB589	42
D196R/K197M/K199E/ R290E	D60R/K60aM/K60cE/ R147E	CB590	43
D196K/K197L	D60K/K60aL	CB610	139
D196F/K197L	D60F/K60aL	CB612	140
D196L/K197L	D60L/K60aL	CB611	141
D196M/K197L	D60M/K60aL	CB613	142
D196W/K197L	D60W/K60aL	CB614	143
D196F/K197E	D60F/K60aE	CB615	144
D196W/K197E	D60W/K60aE	CB616	145
D196V/K197E	D60V/K60aE	CB617	146
K197E/K341Q	K60aE/K192Q	CB637	229
K197L/K341Q	K60aL/K192Q	CB638	230
G237V/K341Q	G97V/K192Q	CB670	231
K197E/G237V/K341Q	K60aE/G97V/K192Q	CB671	235
K197E/K199E	K60aE/K60cE	CB688	232
K197E/G237V	K60aE/G97V	CB689	233
K199E/K341Q	K60cE/K192Q	CB694	234
K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	CB691	250

142

Los polipéptidos FVII que contienen una o más sustituciones de aminoácido en los residuos anteriormente identificados también pueden contener mutaciones adicionales, tales como aquellas descritas en la Publicación de Patente Internacional No. WO2004/083361, Neuenschwander *et al.*, (1995) Biochemistry 34:8701-8707, Chang *et al.*, (1999) Biochemistry 38:10940-10948, e Iakhiaev *et al.*, (2001) Thromb. Haemost. 85:458-463. Por lo tanto, en una modalidad, los polipéptidos FVII suministrados acá pueden contener una o más sustituciones de aminoácido en uno o más residuos de aminoácido de Q176, D196, K197, K199, G237, T239, R290, E296, K341 y Q366, que corresponden a las posiciones de aminoácido de un polipéptido FVII maduro como se establece en la SEQ ID NO:3. Por ejemplo, las una o más mutaciones adicionales pueden incluir, pero no se limitan a, cualquiera o más de Q176A, D196N, G237L, E296A, K341N, K341Q, K341E, Q366A, Q366E y Q366G.

b. **Antitrombina III (AT-III)**

La antitrombina II (también conocida como antitrombina o AT-III) es una serpina anticoagulante importante (inhibidor de serina proteasa). La AT-III es sintetizada como una proteína precursora que contiene 464 residuos de aminoácido (SEQ ID NO:122). En el curso de la secreción un péptido de señal de residuo 32 es roto para generar una antitrombina humana madura de aminoácido 432 (SEQ ID NO:123). La glicoproteína AT-III de 58 kDa circula en la sangre y funciona como un inhibidor de serina proteasa (serpina) para inhibir

143

un número grande de serina proteasas del sistema de coagulación. Los objetivos principales de la AT-III son la trombina y factor Xa, aunque la AT-III también ha sido mostrada para inhibir las actividades de FIXa, FXIa, FXIIa y, para en menor cantidad, FVIIa. La acción de la AT-III es mejorada en gran medida por los glicosaminoglicanos, tales como los sulfato de heparan que ocurren naturalmente o las varias heparinas derivadas de tejido que son ampliamente utilizadas como anticoagulantes en la práctica clínica. El At-II se une en una manera altamente específica a una secuencia única de pentasacárido en heparina que incluye un cambio conformacional en el ciclo reactivo central. En dicha conformación, el ciclo reactivo central de la AT-III puede interactuar más eficientemente con el sitio reactivo de la serina proteasa, y efectuar la inhibición.

La AT-III no es normalmente inhibitoria para liberar FVIIa de plasma, aún en la presencia de heparina, probablemente debido a la conformación similar a zimogén de FVIIa lo cual previene la interacción eficiente con AT-III. Los efectos inhibitorios de la AT-III aumentan, sin embargo, una vez que el FVIIa se compleja con TF. La unión de AT-III al complejo TF/FVIIa puede liberar FVIIa de TF y lo mantiene en un complejo inactivo con AT-III. La afinidad aumentada de AT-III para la unión de TF con FVIIa en comparación con el FVIIa solo refleja presumiblemente la maduración del sitio activo de FVIIa cuando este se compleja con TF, por lo tanto lo hace susceptible a la unión de AT-III (Rao *et al.* (1993) Blood 81:2600-2607). Así, el impacto de la AT-III sobre FVIIa es proporcional a la actividad intrínseca de la molécula FVIIa. Mientras que el

FVIIa retiene su conformación similar a zimogén, la AT-III tiene poco efecto. Si, sin embargo, el FVIIa cambia la conformación a una forma más activa, tal como por la unión de TF, o por las modificaciones *in vitro* específicas, la inhibición de AT-III aumenta significativamente. Los polipéptidos FVIIa que son modificados para tener actividad intrínseca aumentada a menudo muestran aumentos simultáneos en la susceptibilidad la inhibición de AT-III. Por ejemplo, la modificación de uno o más aminoácidos en el bolsillo de activación de FVIIa, tal como por los reemplazos de aminoácido correspondientes a sustituciones de K337A, L305V, M298Q, V158 y E296V (con relación a la secuencia de FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3), resulta en sensibilidad aumentada del polipéptido FVIIa a AT-III inhibiendo así la actividad de FVIIa por hasta el 90% (Persson *et al.* (2001) PNAS 98:13583-13588). En otro ejemplo, la inducción a una conformación más parecida a zimogén por medio de la modificación de aminoácidos involucrado en una α-hélice de FVIIa, mientras que incrementa la actividad de la proteína de FVIIa modificada, también aumenta su susceptibilidad a AT-III (Persson *et al.* (2004) Biochem J 379:497-503).

Modificaciones para efectuar una mayor resistencia a AT-III

Las modificaciones pueden ser hechas a un polipéptido FVII que incrementa su resistencia para la inhibición por AT-III. Generalmente, dichos polipéptidos FVII modificados retienen al menos una actividad de un polipéptido FVII. Típicamente, dichas modificaciones incluyen una o más sustituciones de aminoácido en cualquier posición del polipéptido FVII que están involucrados directamente en la interacción de FVIIa (o el complejo TF/FVIIa) con AT-III o en

145

otros residuos que afectan la posición o conformación de residuos que están directamente involucrados en interacciones entre FVIIa (o el complejo TF/FVIIa) y AT-III. Los polipéptidos FVII modificados que tienen resistencia aumentada para AT-III pueden exhibir una reducción en la medida de inhibición bajo condiciones específicas o en la constante de tasa de segundo orden para la inhibición por AT-III por al 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 medida de inhibición o la constante de tasa de segundo orden para la inhibición de polipéptido FVII tipo salvaje o no modificado bien sea *in vivo, ex vivo,* o *in vitro*. Los polipéptidos FVII modificados son por lo tanto resistentes a los efectos naturalmente inhibitorios de AT-III con respecto a iniciación de coagulación. Cuando se evalúa en un ensayo apropiado *in vitro* o *ex vivo*, o *in vivo*, tal como después de la administración a un sujeto de un terapéutico procoagulante, los polipéptidos FVII resistentes a AT-III modificados muestran actividad coagulante aumentada en comparación con los polipéptidos FVII no modificados.

Como se describe acá más adelante, una persona versada en la materia puede diseñar empírica o racionalmente los polipéptidos FVII modificados que muestran resistencia mejorada a AT-III. Dichos polipéptidos FVII modificados pueden ser probados en ensayos conocidos para los expertos en la materia para determinar si dichos polipéptidos FVII modificados muestran resistencia aumentada a la AT-III. Por ejemplo, la constante de tasa de segundo orden de inhibición por AT-III puede ser medida por dichos polipéptidos FVIIa

modificados. Generalmente, un polipéptido FVII modificado que tiene resistencia aumentada a la AT-III exhibirá unión reducida bajo condiciones específicas (por ejemplo, después de la inyección de una cantidad fija de proteína en un paciente) y/o inhibición reducida por AT-III. Típicamente, dichos ensayos son llevados a cabo en un a forma de cadena doble de FVII, tal como la forma activada de FVII (FVIIa). Además, en ensayos para determinar los efectos de la AT-III son generalmente desarrollados en la presencia de heparina y la presencia de factor de tejido, aunque dichos ensayos también pueden ser llevados a cabo en la ausencia de uno o ambos cofactores.

Los polipéptidos FVII modificados que tienen resistencia aumentada para la AT-III pueden exhibir una reducción en la medida de la inhibición bajo condiciones específicas o en la constante de tasa de segundo orden para la inhibición por AT-III por al 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 en comparación con la medida de inhibición o la constante de tasa de segundo orden para la inhibición de polipéptido FVII no modificado o de tipo salvaje bien sea *in vivo* o *in vitro*. Dichos polipéptidos FVII modificados resultantes que tienen resistencia aumentada para la AT-III pueden exhibir una reducción en la unión y/o afinidad para AT-III por al 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 en comparación con la unión y/o afinidad del polipéptido FVII no modificado o tipo salvaje bien sea *in vivo* o *in vitro*. La resistencia aumentada a la AT-III por

147

dichos polipéptidos FVII modificados también pueden ser manifestados como actividad de coagulación aumentada en la presencia de AT-III. La actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados de AT-III puede ser aumentada por al 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 en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o de tipo salvaje bien sea *in vivo, ex vivo* o *in vitro*.

2. **Unión a Plaquetas Activadas**

Las modificaciones también pueden ser hechas a un polipéptido FVII que aumenta su actividad de coagulación durante la iniciación de coagulación dependiente de TF y/o independiente de TF. Este mecanismo propuesto de iniciación de coagulación independiente de TF involucra la activación directa de FX y FIX por FVIIa (que no está en un complejo con TF), el cual es efectuado en la superficie de una plaqueta activada. El FVIIa se une a las plaquetas activadas a través de una interacción entre los residuos en el dominio Gla del polipéptido FVIIa, y fosfatidilserinas y otros fosfolípidos cargados negativamente expresados en la superficie de la plaqueta. Esta interacción es relativamente débil, y probablemente no juega un papel significativo en la ráfaga inicial de producción de trombina normalmente observada durante la coagulación, la cual es muy probablemente un resultado la actividad dependiente de TF. Como se discutió anteriormente, la iniciación independiente de TF de coagulación y la interacción relativamente débil de FVIIa con la

superficie de plaqueta podría contar para el requerimiento para la administración altas dosis de rFVIIa para lograr la eficacia en la clínica. Por ejemplo, únicamente aproximadamente 1% del 10nM FVII en el plasma está presente como TF/FVIIa, pero la dosis terapéutica de rFVIIa es 90 µg/kg o aproximadamente 50nM en plasma, muy por encima de este nivel. Por lo tanto, las latas dosis de rFVIIa compensan por la unión de afinidad baja de rFVIIa a las plaquetas activadas, que resulta en la actividad de coagulación suficiente del terapéutico durante el tratamiento. Por lo tanto, de interés terapéutico son los polipéptidos FVII modificados que pueden ser administrados como dosis menores debido a la unión aumentada y/o afinidad para las plaquetas activadas, suficiente para llevar a cabo la iniciación de la coagulación. Los polipéptidos FVII modificados acá suministrados son diseñados para exhibir unión y/o afinidad aumentada para las plaquetas activadas a través de la modificación del dominio Gla.

La interacción de residuos en el dominio Gla γ-carboxilatado de proteínas de plasma dependientes de vitamina K, tales como FVII, FIX, FX, protrombina, proteína C y proteína S, fosfolípidos cargados negativamente en la superficie de membrana es importante para la hemostasia. Los dominios Gla de las proteínas de plasma dependientes de vitamina K típicamente contienen aproximadamente 45 aminoácidos, de los cuales 9 a 12 residuos de ácido glutámico son post-translacionalmente modificados por la carboxilación dependiente de vitamina K para formar γ-carboxiglutamato (Gla). Los aminoácidos que forman el dominio Gla están posicionados inmediatamente

después de aquellos que forman el péptido señal y propéptido de las proteínas, y son por lo tanto situados en el término N seguido al procesamiento y ruptura 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 establecido en la SEQ ID NO:1, posiciones 61-105 del polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO:2, y posiciones 1 a 45 del polipéptido maduro establecido en la SEQ ID NO:3. De estos, los residuos de ácido glutámico 10 en las posiciones E6, E7, E14, E19, E20, E25, E26, E29 y E35 del polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3 son modificados por la carboxilación para generar residuos de γ-carboxiglutamato (Gla).

Debido a que el ácido glutámico es sólo un quelante de Ca^{2+} débil y el γ-carboxiglutamato es uno mucho más fuerte, este paso de modificación por la carboxilasa de vitamina K incrementa significativamente la afinidad de unión del Ca^{2+} del dominio Gla de la proteína. El calcio también se une al dominio de proteasa de FVIIa, donde este facilita los cambios conformacionales requeridos para la actividad óptima. A través de la unión a sitios en ambos dominios Gla y de proteasa de FVIIa, el calcio mejora la unión a TF y fosfolípidos así como la eficiencia catalítica para la activación de FX. El dominio Gla γ-carboxilatado une siete iones Ca^{2+} con afinidad variable, lo cual induce el cambio conformacional que habilita el dominio Gla para interactuar con el dominio C-terminal de TF. La unión de Ca^{2+} también promueve la interacción de FVIIa con fosfolípidos cargados negativamente en la membrana de plaqueta, cuya masa

150
465

son fosfatidilserinas. La fosfatildiserina (PS) es un componente clave en la membrana negativamente cargada que soporta la coagulación sanguínea. En la mayoría de las células, la PS está presente en la hojuela interior de la membrana celular, y por lo tanto no está expuesta al plasma. Los procesos celulares específicos, tales como activación de plaquetas, resulta en translocación de PS a la superficie exterior orientada al plasma, que presenta un sitio de unión para el dominio de Gla de proteínas dependientes de vitamina K (Hemker *et al.* (1983) Blood Cells 9:303-317).

Adicional a su involucramiento en las interacciones de FVIIa con TF y plaquetas activadas, el dominio Gla de FVIIa también está implicado en la unión y activación de FX. Esto puede ser a través de un mecanismo indirecto, en el cual el dominio Gla de FVIIa ayuda a linear Lys^{165} y Lys^{166} de TF con el dominio Gla de FX, un paso importante en la activación de FX a FXa. Alternativamente, el dominio Gla de FVIIa interactúa directamente con el dominio Gla de FX para alinear correctamente la enzima y el sustrato antes de la activación (Neuenschwander *et al.* (1994) J Biol Chem 269:8007-8013, Huang *et al.* (1996) J Biol Chem 271:21752-21757). La arginina en la posición 36 del FVIIa ha sido mostrada para ser importante para el acoplamiento efectivo del dominio Gla de FX en la ausencia de fosfolípidos, demostrando que el dominio Gla de FVIIa participa en las interacciones de proteína-proteína con FX (Ruf *et al.* (1999) Biochemistry 38:1957-1966).

Aunque los dominios Gla de las diferentes proteínas de plasma dependientes de vitamina K muestran homología dignificante, ellas se unen a

las membranas de fosfolípidos cargados negativamente con afinidad muy diferente, con constantes de disociación (K_d's) que varían por más de 1000 dobleces. El FVII humano muestra una de las afinidades más bajas para las membranas de fosfolípidos entre estas proteínas (McDonald *et al.* (1997) Biochemistry 36:5120-5127). Las interacciones precisas responsables de la unión del dominio Gla al PS no son completamente entendidas, aunque parece que los residuos de aminoácido individuales dentro de este dominio contribuyen a las afinidades diferentes observadas. Estudios tempranos indicaron que hubo una correlación entre los aminoácidos en las posiciones 10, 32 y 33 (con relación a la proteína de FVII madura) y afinidad total de membrana (McDonal *et al,* (1997) Biochemistry 36:5120-5127). El análisis de la mutación subsecuente también ha revelado que los residuos específicos contribuyen a la afinidad de unión. Por ejemplo, el reemplazo de la histidina en la posición 10 de la forma madura de proteína C con una prolina resultó en una reducción de 3 dobleces en la afinidad de membrana (Shen *et al.* (1997) Biochemistry 36:16025-16031). Inversamente, la mutación de residuos específicos en el dominio Gla de las proteínas de plasma dependientes de vitamina K puede producir las proteínas con afinidad de membrana mayor, y funciones mejoradas. Los efectos de la mutación en ciertas posiciones dentro del dominio Gla, sin embargo, no son necesariamente conservados entre las diferentes proteínas. Por ejemplo, la mutación de proteína C bovina por sustitución de Q32E y N33D medió un incremento amplio en la unión de membrana, mientras que las mutaciones correspondientes en la proteína C de

humano mostraron cambios mínimos en la unión. La mutación análoga de FVII humano (K32E) resultó en un incremento de 13 dobleces en la afinidad de unión en comparación con la proteína de FVII de tipo salvaje (Harvey *et al.* (2003) J Biol Chem 278:8363-8369).

a. Modificación por medio de la introducción de un dominio Gla heterólogo

Debido a su afinidad a la unión relativamente baja para las plaquetas activadas, el dominio Gla de FVII es un objetivo para la modificación, con el propósito de mejorar la interacción entre el FVII modificado y la membrana de fosfolípidos, incrementando así la actividad de coagulación. La modificación puede ser efectuada por la sustitución de aminoácidos específicos que están involucrados en esta interacción (ver por ejemplo, Shah *et al.* PNAS 95: 4429-4234, Harvey *et al.* (2003) J Biol Chem 278:8363-8369). Alternativamente, la modificación puede ser efectuada por medio de la sustitución de todo el dominio Gla con el dominio Gla de otra proteína dependiente de vitamina K, es decir, un intercambio de dominio Gla. Este tipo de modificación resulta en una proteína quimérica, tal como aquella que resultó cuando el dominio Gla de proteína C fue reemplazado con el dominio Gla de FVII (Geng *et al.* (1997) Thromb Haemost 77:926-933).

Típicamente, dicha modificación incluye la introducción, tal como por adición o sustitución, de un dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo para efectuar la unión de fosfolípidos en una región del polipéptido FVII para generar un polipéptido FVII modificado quimérico. Generalmente, dicho

polipéptido FVII quimérico retiene al menos una actividad de FVII. La unión y/o afinidad de polipéptidos FVII de Gla modificado para las plaquetas activadas puede ser aumentada por al 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 en comparación con la unión y/o afinidad del polipéptido FVII no modificado o tipo salvaje bien sea *in vivo* o *in vitro*. La unión y/o afinidad por las plaquetas activadas por los polipéptidos FVII modificados también puede ser manifestado como actividad de coagulación aumentada. La actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados de Gla puede ser aumentada por al 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 en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o tipo salvaje bien sea *in vivo* o *in vitro*.

Un dominio Gla, o una porción suficiente del mismo, contenido dentro de cualquier polipéptido puede ser utilizado como una fuente de un dominio Gla heterólogo para la introducción o reemplazo de una región de un polipéptido FVII. Típicamente, dicho dominio Gla heterólogo exhibe afinidad de unión para fosfolípidos, por ejemplo, fosfolípidos presentes en la superficie de una plaqueta activada. Generalmente, la selección de un dominio Gla heterólogo es una en la cual se exhiba afinidad más alta por fosfolípidos en comparación con la afinidad del dominio Gla de FVII. El dominio Gla exacto, o una porción suficiente del mismo, utilizado como un dominio heterólogo para la modificación de un polipéptido FVII puede ser racionalmente o empíricamente determinado.

Los 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 detención del crecimiento (Gas6), y proteína Z. Los dominios Gla de estas proteínas ejemplares se establecen en cualquiera de las SEQ ID NOS:110-118, 120 y 121. Por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o más aminoácidos contiguos, o el dominio Gla completo, de un dominio Gla heterólogo que puede ser introducido en un polipéptido FVII. Adicionalmente, la introducción del dominio Gla en un polipéptido FVII también puede incluir aminoácidos adicionales que no son parte del dominio Gla del polipéptido heterólogo siempre y cuando los aminoácidos adicionales no debiliten significativamente la habilidad de unión de fosfolípidos del dominio Gla introducido.

En algunos ejemplos, la introducción es por medio de la adición del dominio Gla al polipéptido FVII de modo tal que el dominio Gla heterólogo es insertado en el dominio Gla endógeno o en otra región o dominio del polipéptido FVII siempre y cuando el polipéptido FVII modificado retenga al menos una actividad del FVII. En dichos ejemplos, el dominio Gla nativo del polipéptido FVII es retenido en el polipéptido, aunque en algunos casos la secuencia de aminoácido que hace el dominio Gla nativo es interrumpida. En otros ejemplos, el dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo, es insertado adyacente a, bien sea en el término N o C, del dominio Gla nativo de modo tal que el dominio Gla nativo no es interrumpido. En un ejemplo

adicional, el dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo, es insertado en otro dominio del polipéptido FVII.

Acá también se suministran los polipéptidos FVII de dominio Gla modificado donde todo o una porción contigua del dominio Gla endógeno de FVII es removido con un dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo para efectuar la unión de fosfolípidos, siempre y cuando el polipéptido FVII modificado retenga al menos una actividad de FVII. Dicha modificación también es referida como intercambio de dominio Gla. Por ejemplo, todo o una porción del dominio Gla de FVII, tal como se establece en la SEQ ID NO:119, que corresponde a los aminoácidos 1-45 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:3, puede ser removida de un polipéptido FVII y reemplazado con un dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo. La porción heteróloga incluye cualquier dominio Gla conocido para el experto en la materia que une a fosfolípidos, incluyendo, pero no limitado a, un dominio Gla que tiene la secuencia de amino ácidos establecidos en cualquiera de las SEQ ID NOS: 110-118, 120 y 121. En algunos casos, una porción suficiente de un dominio Gla, tal como una porción suficiente de cualquiera de las SEQ ID NO:110-118, 120 y 121 para efectuar la unión de fosfolípidos, puede reemplazas el dominio Gla endógeno, o una porción del dominio Gla endógeno, de FVII. Por ejemplo, el dominio Gla de FVII puede ser intercambiado con el dominio Gla de la Proteína C establecida en la SEQ ID NO:113. El polipéptido FVII modificado resultante contiene un dominio Gla de la proteína C seguida por su propia dominio de EGF-1, EGF-2 y serina proteasa.

156

~~171~~

En algunos ejemplos, el dominio Gla heterólogo contiene mutaciones que además efectúan la unión aumentada para las plaquetas activadas, debido la unión aumentada de fosfolípidos. Por ejemplo, si el dominio Gla de la proteína C es introducido para generar un polipéptido FVII modificado, el dominio Gla de la proteína C puede contener mutaciones de aminoácido que confieren unión aumentada a fosfolípidos.

En otros ejemplos, el dominio Gla heterólogo puede contener mutaciones adicionales que confieren funciones similares a FVII al dominio Gla. Por ejemplo, como se notó anteriormente, el R36 del dominio Gla de FVII establecido en la SEQ ID NO:119 puede estar involucrado en las interacciones con FX. Así, 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 establece en la SEQ ID NO:3, o cualquier otra modificación requerida para mantener las propiedades de activación de FX del polipéptido FVII modificado (Ruf *et al.* (1999) Biochem 38:1957-1966). Por lo tanto, en algunos ejemplos, una mutación que corresponde a R36 puede ser hecha en el dominio Gla heterólogo. La posición correspondiente puede ser determinada por una persona versada en la materia, tal como mediante la alineación de secuencias de aminoácidos.

Como se describió acá anteriormente, un experto en la materia puede empírica o racionalmente diseñar polipéptidos FVII modificados que contienen un dominio Gla heterólogo de modo tal que el polipéptido FVII resutante retiene al menos una actividad de FVII. Típicamente, dichos polipéptidos FVII

157

modificados retienen su habilidad para unir y activar FX. En algunos casos, dichos polipéptidos FVII modificados también retienen su habilidad para unir y activar FIX. Los polipéptidos FVII modificados de Gla incluyen aquellos que retienen su habilidad para unirse a TF. Los polipéptidos FVII modificados de Gla intercambiado también incluyen aquellos que tienen actividad intrínseca aumentada en la ausencia de TF: Así, los polipéptidos FVII modificados de Gla resultantes incluyen aquellos que no unen TF o que unen TF de forma pobre en comparación con el FVIIa de tipo salvaje. Típicamente, dichos polipéptidos FVII modificados muestran una unión a fosfolípidos aumentada. En particular, dichos polipéptidos FVII modificados exhiben una unión aumentada a la fosfatidilserina. La unión aumentada a fosfolípidos puede ser ensayada en fosfolípidos aislados o en la superficie de las plaquetas activadas. Dichos ensayos son típicamente llevados a cabo en una forma de cadena doble de FVII, tal como la forma activada de FVII (FVIIa).

Acá se suministran polipéptidos FVII modificados que contienen un dominio Gla heterólogo. Los ejemplos de dichos polipéptidos FVII modificados son aquellos en los cuales el dominio Gla heterólogo es reemplazado con todo o una porción del dominio Gla de cualquiera de FIX (SEQ ID NO:110), FX (SEQ ID NO:111), trombina (SEQ ID NO:112), proteína C (SEQ ID NO:113) o proteína S (SEQ ID NO:114). Dichos polipéptidos FVII modificados pueden exhibir unión aumentada a las plaquetas activadas, resultando en una actividad coagulante aumentada. La Tabla 7 establece modificaciones ejemplares que pueden ser hechas a un polipéptido FVII para reemplazar el dominio Gla

endógeno con aquel de FIX, FX, proteína C, proteína S o trombina. La tabla proporciona el nombre de la modificación (por ejemplo Gla Intercambio FX) y los detalles de la modificación, incluyendo las posiciones de aminoácido en las cuales el dominio Gla exógeno es insertado en el polipéptido FVII, y la secuencia del dominio Gla exógeno. El identificador de secuencia (SEQ ID NO) también se proporciona en el cual las secuencias de aminoácido ejemplares del polipéptido FVII modificado son establecidas, y también cualquier número de identificación de polipéptido. Por ejemplo, la modificación "Gla Intercambio FIX" (A1Y44delinsYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWK QY) involucra la eliminación del dominio Gla endógeno mediante la eliminación de los residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII modificado maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de residuos de aminoácido 45 que corresponden a los residuos de aminoácido Y1 a Y45 del dominio Gla establecido en la SEQ ID NO:110. De forma similar, la modificación Gla Intercambio FX involucra la eliminación de residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de residuos de aminoácido 44 que corresponden a A1 a Y44 del dominio Gla FX establecido en la SEQ ID NO:111. La modificación Gla Intercambio Trombina involucra la eliminación de residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de residuos de aminoácido 44 que corresponde a los residuos de aminoácido Y1 a Y44 del dominio Gla de Trombina establecido en la SEQ ID NO:112. La

159

174

modificación Gla Intercambio Proteína C involucra la eliminación de residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de residuos de aminoácido 44 que corresponde a los residuos de aminoácido A1 a H44 del dominio Gla de Proteína C establecido en la SEQ ID NO:113. La modificación Gla Intercambio Proteína S involucra la eliminación de residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de residuos de aminoácido 44 que corresponde a los residuos de aminoácido Y1 a Y44 del dominio Gla de Proteína S establecido en la SEQ ID NO:114.

Tabla 7

Nombre de la Modificación	Numeración de la Modificación – FVII maduro	Numeración de la Modificación - quimotripsina	No. De ID de poli-péptido	SEQ ID NO
Gla Intercambio FIX	A1Y44delinsYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQY	A[1]Y[44]delinsYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQY	CB728	236
Gla Intercambio FX	A1Y44delinsANSFLEEMKKGHLERECMEETCSYEEAREVFEDSDKTNEFWNKY	A[1]Y[44]delinsANSFLEEMKKGHLERECMEETCSYEEAREVFEDSDKTNEFWNKY	CB729	237
Gla Intercambio	A1Y44delinsANSFLEELRHSS	A[1]Y[44]delinsANSFLEELR	CB730	238
Prot C	LERECIEEICDFEEAKEIFQNVDDTLAFWSKH	HSSLERECIEEICDFEEAKEIFQNVDDTLAFWSKH		
Gla Intercambio Prot S	A1Y44delinsANSLLEETKQGNLERECIEELCNKEEAREVFENDPETDYFYPKY	A[1]Y[44]delinsANSLLEETKQGNLERECIEELCNKEEAREVFENDPETDYFYPKY	CB731	239
Gla Intercambio Trombina	A1Y44delinsANTFLEEVRKGNLERECVEETCSYEEAFEALESSTATDVFWAKY	A[1]Y[44]delinsANTFLEEVRKGNLERECVEETCSYEEAFEALESSTATDVFWAKY	CB732	240

Los polipéptidos FVII modificados que contienen un dominio Gla heterólogo pueden exhibir actividad coagulante aumentada en dosis más bajas en comparación con una molécula de FVII de tipo salvaje, tal como NovoSeven®, debido a la unión y/o afinidad aumentada para las plaquetas

160

125

activadas. La actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados de Gla puede ser aumentada por al 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 en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o tipo salvaje bien sea *in vivo, ex vivo* o *in vitro*.

3. **Combinaciones y Modificaciones Adicionales**

Adicional a la modificación de los polipéptidos FVII para tener resistencia a TFPI aumentada, resistencia aumentada a AT-III, actividad catalítica aumentada dependiente de TF y/o independiente de TF, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media aumentada, y/o afinidad y/o unión aumentada para membranas de fosfolípidos, los polipéptidos FVII modificados acá suministrados también incluyen aquellos que exhiben más de una de las propiedades anteriormente mencionadas. Por ejemplo, un polipéptido FVII puede ser modificado de modo tal que el polipéptido resultante muestra unión y/o afinidad aumentada para fosfolípidos y también muestra resistencia incrementada a TFPI. De acuerdo con esto, un polipéptido FVII puede ser modificado por la introducción de un dominio Gla heterólogo de otra proteína de plasma dependiente de vitamina K y por sustitución de uno o más de los aminoácidos en las posiciones 196, 197, 199, 237, 239, 290 o 342 con relación al polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3.

Además, cualquier polipéptido FVII modificado suministrado acá también puede contener una o más modificaciones descritas en el arte. Típicamente,

dichas modificaciones adicionales son aquellas que resultan por si solas en una actividad coagulante aumentada del polipéptido modificado y/o estabilidad aumentada del polipéptido. De acuerdo con esto, los polipéptidos FVII modificados resultantes exhiben una actividad coagulante aumentada. Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, cualquier sustitución, supresión o inserción de aminoácido conocida en el arte, típicamente cualquiera que aumente la actividad y/o estabilidad coagulante del polipéptido FVII. Cualquier polipéptido FVII modificado suministrado acá puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más modificaciones adicionales de aminoácido, siempre y cuando el polipéptido FVII modificado retenga una actividad FVII del polipéptido tipo salvaje o no modificado.

En un ejemplo, la modificación adicional puede ser hecha a la secuencia de polipéptido FVII de modo tal que su interacción con otros factores, moléculas y proteínas se altera. Por ejemplo, los residuos de aminoácido que están involucrados en la interacción con el factor de tejido (TF) pueden ser reemplazados de modo tal que la afinidad del polipéptido FVII modificado para el TF se aumenta. Otras modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificación de aminoácidos que están involucrados en interacciones con el factor X, factor IX, TFPI y AT-III.

Las modificaciones adicionales también pueden ser hechas a un polipéptido FVII modificado acá suministrado que altera la conformación o doblez del polipéptido. Estos incluyen, por ejemplo, el reemplazo de uno o más

162

aminoácidos con una cisteína de modo tal que una nueva unión de disulfuro se forma, o modificaciones que estabilizan una conformación de hélice α, impartiendo así la actividad aumentada al polipéptido FVII modificado.

Las modificaciones adicionales también pueden ser hechas al polipéptido FVII para llevar a cabo las modificaciones postranslacionales. Por ejemplo, el polipéptido puede ser modificado para incluir sitios de glicosilación adicionales de modo tal que el polipéptido FVII modificado resultante tiene glicosilación aumentada en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Las modificaciones también pueden ser hechas para introducir residuos de aminoácido que puedan ser subsecuentemente vinculadas a una porción química, tal como una que actúa para aumentar la estabilidad del polipéptido FVII modificado. Un polipéptido FVII también puede ser alterado mediante la modificación de los sitios de ruptura potenciales para las proteasas endógenas, disminuyendo así la degradación del variante de FVIIa y aumentando la estabilidad del polipéptido FVII modificado.

Adicionalmente, las sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos pueden ser hechas en el dominio Gla endógeno o heterólogo de modo tal que el polipéptido FVII modificado muestra unión y/o afinidad aumentada por las membranas de fosfolípidos. En otros ejemplos, los polipéptidos FVII modificados acá suministrados pueden mostrar eliminaciones en lel dominio Gla endógeno, o sustituciones en las posiciones que son normalmente gama-carboxiladas (US20070037746).

Las siguientes secciones describen ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en el arte para efectuar la estabilidad y/o actividad coagulante mejorada de un polipéptido FVII. Como se discutió anteriormente, dichas modificaciones también pueden ser incluidas adicionalmente en cualquier polipéptido FVII modificado acá suministrado. Las posiciones de aminoácido que se relacionan más adelante corresponden al polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3. Las mutaciones correspondientes pueden ser hechas en otros polipéptidos FVII, tales como variantes alélicas, especies o empalmes del polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3.

a. **Modificaciones que aumentan la actividad intrínseca**

En un ejemplo, modificaciones adicionales pueden hechas al polipéptido factor VII modificado acá suministrado que resulta en actividad catalítica aumentada hacia el factor X y/o factor IX. Por ejemplo, las modificaciones pueden ser hechas a los aminoácidos que están involucrados en la interacción con su cofactor, TF, de modo tal que el polipéptido FVII modificado resultante tiene afinidad aumentada para TF, y por lo tanto muestra actividad aumentada hacia FX y/o FIX. Las modificaciones también pueden ser hechas al bolsillo de activación del polipéptido FVII, de modo tal que la actividad intrínseca del polipéptido FVII modificado hacia FX y/o FIX se aumenta en comparación con la actividad del polipéptido no modificado. Otra estrategia de modificación que resulta en actividad aumentada involucra la modificación del polipéptido FVII de modo tal que el doblez y conformación de la proteína se altera a una forma más

activa o un equilibrio entre conformaciones altamente activas e inactivas (o menos activas) se cambia en favor de las conformaciones altamente activas. Un polipéptido más activo también puede ser logrado por medio de la modificación de los aminoácidos involucrados en las cadenas β del polipéptido FVII. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácido pueden ser hechas para introducir nuevos pares de cisteína que pueda formar nuevas uniones de disulfuro el cual funciona para "bloquear" al polipéptido FVII modificado en una forma más activa.

Los ejemplos de modificaciones adicionales que pueden ser incluidas en los polipéptidos FVII modificados suministrados acá para aumentar la actividad intrínseca del polipéptido FVII modificado incluyen, pero no se limitan a, aquellas descritas en Persson *et al.* (2004) Biochem J. 379:497-503, Maun *et al.* (2005) Prot Sci 14:1171-1180, Persson *et al.* (2001) PNAS 98:13583-13588, Persson *et al.* (2002) Eur J Biochem 269:5950- 5955, Soejima *et al.* (2001) J Biol Chem 276:17229-17235, Soejima *et al.* (2002) J Biol Chem 277:49027-49035, WO200183725, WO2002022776, WO2002038162, WO2003027147, WO200338162, WO2004029090, WO2004029091, WO2004108763 y WO2004111242. Los ejemplos no limitantes de las modificaciones ejemplares de aminoácido descritas en el arte que pueden resultar en actividad intrínseca aumentada del polipéptido FVII modificado incluyen cualquiera de S278C/V302C, L279C/N301C, V280C/V301C, S281C/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,

165

~~18C~~

E77A, E82Q, E82N, T83K, EI 16D, 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, M298Y, M298N, M298K, M298R, M298H, M298E, M298D, R304Y, R304F, R304L, R304M, L305V, L305Y, L305I, L305F, L305A, L305M, L305W, L305P, L305G, L305S, L305T, L305C, L305N, L305E, L3O5K, L305R, L305H, L305D, L305Q, M306D, M306N, D309S, D309T, S314A, S314V, S3141, 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, K.337R, K337H, K337D, K337Q, F374P, F374A, F374V, F374I, F374L, F374M, F374W, F374G, F374S, F374T, F374C, F374Y, F374N, F374E, F374K, F374R,

F374H, F374D, F374Q, y sustituciones de las posiciones 300-322, 305-322, 300-312, o 305-312 con los aminoácidos correspondientes de tripsina, trombina o FX, y sustituciones de las posiciones 310-329, 311-322 o 233-329 con los aminoácidos correspondientes de tripsina.

b. Modificaciones que aumentan la resistencia a proteasas

Los polipéptidos FVII modificados acá suministrados también pueden contener modificaciones adicionales que resultan en resistencia aumentada del polipéptido a proteasas. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácido pueden ser hechas para remover uno o más sitios potenciales de ruptura proteolítica. Los polipéptidos FVII modificados pueden así estar hechos más resistentes a proteasas, incrementando así la estabilidad y vida media al polipéptido modificado.

Los ejemplos de modificaciones adicionales que pueden ser incluidas en los polipéptidos FVII modificados acá suministrados para aumentar la resistencia a proteasas incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en la Patente de Estados Unidos No. US5580560 o en las Solicitudes Internacionales Publicadas Nos. WO1988010295 y WO2002038162. Los ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en el arte que pueden resultar en resistencia aumentada del polipéptido FVII modificado a los inhibidores y/o proteasas incluyen uno 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.

c. **Modificaciones que aumentan la afinidad por fosfolípidos**

La actividad coagulante de FVII puede ser mejorada por el aumento de la unión y/o afinidad del polipéptido por los fosfolípidos, tal como aquellos expresados en la superficie de las plaquetas activadas. Por ejemplo, las sustituciones adicionales de aminoácido pueden ser hechas en posiciones particulares en el dominio Gla endógeno de un polipéptido FVII que resulta en un polipéptido FVII modificado con habilidad aumentada para unir fosfatidilserina y otros fosfolípidos cargados negativamente. Por lo tanto, dichas modificaciones también pueden ser incluidas en un polipéptido FVII modificado suministrado acá, dichos polipéptidos FVII modificados poseen un dominio Gla endógeno, es decir, no han sido todavía sujetos a modificación que resulta en la sustitución del dominio Gla endógeno con otra proteína dependiente de vitamina K.

Los ejemplos de modificaciones adicionales para aumentar la unión y/o afinidad de fosfolípidos y que pueden ser hechas a un polipéptido FVII modificado acá suministrado que contiene un dominio Gla endógeno, incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Harvey *et al.* (2003) J Biol Chem 278:8363-8369, US20030100506, US20040220106, US20060240526,

US6017882, US6693075, US6762286, WO200393465 y WO2004111242. Ejemplos de dichas modificaciones incluyen uno o más de; una inserción de una tirosina en la posición 4, o modificación de uno o más 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.

d. Modificaciones que alteran la glicosilación

La alteración de los niveles de glicosilación de una proteína ha sido descrita en el arte como un medio parea reducir la inmunogenicidad, aumentar estabilidad, reducir la frecuencia de la administración y/o reducir los efectos secundarios adversos tales como inflamación. Normalmente, esto es llevado a cabo por el aumento de los niveles de glicosilación. Los sitios de glicosilación suministran un sitio para la unión de una porción de carbohidrato en el polipéptido, de modo tal que cuando el polipéptido es producido en una célula eucariótica capaz de la glicosilación, este es glicosilado.

Existen cuatro sitios de glicosilación que ocurren normalmente en el FVII; dos sitios de N-glicosilación en N145 y N322, y dos sitios de O-glicosilación en S52 y S60, que corresponden a las posiciones de aminoácido en el polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3. En una modalidad, las modificaciones adicionales pueden ser hechas a un polipéptido FVII modificado suministrado acá de modo tal que la glicosilación en los sitios anteriores se perturba. Esto puede resultar en un polipéptido FVII modificado con actividad coagulante aumentada (ver, por ejemplo, WO2005123916). Los ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en el arte que

169

pueden resultar en glicosilación reducida y actividad aumentada del polipéptido FVII modificado en comparación con un polipéptido FVII no modificado incluyen, pero no se limitan a; N145 Y, 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, las modificacicnes adicionales pueden ser hechas a la secuencia de aminoácido de los polipéptidos FVII modificados acá suministrado de modo tal que los sitios adicionales de glicosilación son introducidos, aumentando así el nivel de glicosilación del polipéptido FVII modificado en comparación con un polipéptido FVII no modificado. El sitios de glicosilación puede ser un sitio de glicosilación N-vinculado o O-vinculado. Los ejemplos de las modificaciones que pueden ser hechas a un polipéptido FVII que introduce uno o más nuevos sitios de glicosilación incluyen, pero no se limitan a, aquellos que son descritos en US6806063 y WO200393465. Los ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en el arte que pueden resultar en glicosilación aumentada del polipéptido FVII modificado en comparación 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,

170

184

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/W41 S, 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/D289, 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, K341 N/ 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, 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.

171

~~186~~

e. **Modificaciones para facilitar la vinculación deL grupo químico**

Las modificaciones adicionales de un polipéptido FVII modificado acá suministrado también pueden ser hechas para facilitar la vinculación subsecuente de un grupo químico. Una o más sustituciones o inserciones de aminoácido pueden ser hechas de modo tal que un grupo químico puede ser vinculado a un polipéptido FVII modificado por medio del aminoácido sustituido. Por ejemplo, una cisteína puede ser introducida a un polipéptido FVII modificado, al cual se puede vincular una porción de polietilenglicol (PEG) para conferir estabilidad y vida media de suero aumentadas. Otros residuos de unión incluyen lisina, ácido aspártico y residuos de ácido glutámico. En algunas modalidades, los residuos de aminoácidos son reemplazados para reducir el número de posiciones de vinculación potencial. Por ejemplo, el número de lisinas puede ser reducida. Los ejemplos de modificaciones que pueden ser hechas a la secuencia de aminoácido de un polipéptido FVII el cual puede facilitar la vinculación subsecuente con un grupo químico incluye, pero no se limita a, aquellos que se describen en US20030096338, US20060019336, US6806063, WO200158935 y WO2002077218. Los ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares de polipéptidos FVII que pueden facilitar la vinculación 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,

172

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, K18R, 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.

f. Ejemplos de modificaciones de combinación

Acá se suministrar polipéptidos FVII modificados que tienen dos o más modificaciones diseñadas para afectar una o más 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 polipéptidos FVII. Las modificaciones pueden ser hechas a los polipéptidos FVII de modo tal que una o más de resistencia a TFPI, resistencia a AT-III, actividad intrínseca, actividad amidolítica, activiada catalítica (en la presencia o ausencia de TF), unión y/o afinidad a fosfolípidos, glicosilación, resistencia a proteasas, vida media e interacción con y/o activación de otros factores o moléculas, tales como FX y FIX, es alterado. Típicamente, las dos o más modificaciones son combinadas de modo tal que el polipéptido FVII modificado resultante tiene actividad coagulante aumentada, duración reducida de la actividad de coagulación, y/o un índice terapéutico mejorado en comparación con un polipéptido FVII no modificado. El polipéptido FVIIa modificado puede exhibir un inicio más rápido de actividad coagulante bien sea *in vitro, ex vivo,* o *in vivo.* Las modificaciones pueden incluir sustitución, inserción o eliminación de aminoácido. La actividad coagulante mejorada, duración aumentada de actividad coagulante, inicio incrementado de actividad coagulante, y/o índice terapéutico mejorado del polipéptido FVII modificado que contiene dos o más modificaciones puede ser aumentada por al 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 en comparación con la actividad del polipéptido FVIIa iniciador o no modificado.

Acá se suministran polipéptidos FVII modificados que contienen dos o más modificaciones que son introducidas en 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 involucrar uno o más residuos de aminoácido. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede contener dos modificaciones cada una de las cuales es una sustitución simple de aminoácido. En otro ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede contener dos modificaciones, una de las cuales es una sustitución simple de aminoácido y la otra involucra la eliminación de más de un residuo de aminoácido y luego la inserción de más de un residuo de aminoácido. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado acá suministrado puede contener la sustitución de aminoácido M298Q (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) para aumentar la actividad intrínseca y una modificación Gla Intercambio FIX, la cual involucra la eliminación del dominio Gla de FVII endógeno mediante la eliminación de los residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de 45 residuos de aminoácido que corresponden a los residuos de aminoácido Y1 a Y45 del dominio Gla de FIX establecido en la SEQ ID NO:110.

Los polipéptidos FVII modificados acá suministrados pueden tener dos o más modificaciones seleccionadas únicamente de aquellas establecidas en las Tablas 5 a 8. En otros ejemplos, el polipéptido FVII modificado contiene dos o más modificaciones donde una o más modificaciones se seleccionan de aquellas establecidas en las Tablas 5 a 8 y una o más modificaciones son modificaciones adicionales que no se establecen en las Tablas 5 a 8, tales

175

197

como, por ejemplo, modificaciones descritas en el arte. En algunos ejemplos, las modificaciones adicionales pueden ser seleccionadas de aquellas establecidas en la Sección D.3.a-e arriba. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede contener una modificación en uno o más residuos de aminoácido D196, K197, K199, G237, T239, R290 o K341 con base en la numeración de un FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3 (que corresponde a D60, K60a, K60c, G97, T99, R147 y K192, respectivamente, con base en numeración de quimotripsina), la cual puede aumentar la resistencia al TFPI, y una modificación de uno más residuos de aminoácido que afectan 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 aumentan la resistencia a TFPI, tal como K197E y G237V, y una sustitución de aminoácido que aumenta la actividad intrínseca, tal como M298Q, que resulta en un polipéptido FVII con actividad coagulante incrementada.

Las modificaciones de combinación ejemplares no limitantes se suministran en la Tabla 9. Estas modificaciones de combinación ejemplares incluyen dos o más modificaciones que son diseñadas para alterar dos o más actividades o propiedades de un polipéptido FVII, incluyendo, pero no limitado a, resistencia a TFPI, resistencia a AT-III, actividad intrínseca, actividad amidolítica, activiada catalítica (en la presencia y/o ausencia de TF), unión o afinidad a fosfolípidos, glicosilación, resistencia a proteasas, vida media e

176

~~Y91~~

interacción con y/o activación de otros factores o moléculas, tales como FX y FIX. Los polipéptidos FVII modificados que contienen dichas modificaciones de combinación pueden tener actividad coagulante aumentada, duración aumentada de actividad coagulante, inicio aumentado de actividad coagulante y/o un índice terapéutico mejorado. Las modificaciones establecidas en la Tabla 8 a continuación usan los mismos sistemas de nomenclatura y numeración como se describen en las Tablas 5 a 7, anteriores. Por ejemplo, la modificación "Gla Intercambio FIX) involucra la eliminación del dominio Gla de FVII endógeno mediante la eliminación de residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de 45 residuos de aminoácido que corresponden a los residuos de aminoácido Y1 a Y45 del dominio Gla de FIX establecido en la SEQ ID NO:100, como se describió anteriormente. Las posiciones de aminoácido corresponden a posiciones de aminoácido de un polipéptido FVII maduro como se establece en la SEQ ID NO:3 y también están relacionadas por el esquema de numeración de quimotripsina. En la Tabla 9 más adelante, el identificador de secuencia (SEQ ID NO) es identificado en el cual las secuencias de aminoácido ejemplares del polipéptido FVII modificado se establecen, y también cualquier número de identificación de polipéptido.

Tabla 8

177

Modificación – numeración de FVII maduro	Modificación – numeración de quimotripsina	Número ID de Poli-péptido	SEQ ID NO
V158D/G237V/E296V/M298Q	V21D/G97V/E154V/M156Q	CB669	241
K197E/G237V/M298Q	K60aE/G97V/M156Q	CB690	242
K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	CB692	243
K197E/K199E/G237V/M298Q/ K341Q	K60aE/K60cE/G97V/M156Q/ K192Q	CB693	244
G237V/M298Q	G97V/M156Q	CB695	245
G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	CB696	246
M298Q/Gla Swap FIX	M156Q/Gla Swap FIX	CB850	247
K197E/M298Q	K60aE/M156Q	CB902	248
M298Q/K341D	M156Q/K192D	CB945	249

E. Diseño y Métodos para Modificar FVII

Acá se suministran polipéptidos FVII modificados. Los polipéptidos FVII son modificados de modo tal que ellos exhiben alteraciones en una o más actividades o propiedades en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Las actividades y propiedades que pueden ser alteradas como resultado de la modificación incluyen, pero no se limitan a, coagulación o actividad coagulación; actividad procoagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como actividad que efectúa la activación del factor X (FX) o la activación del factor IX (FIX); antigenicidad, tal como la evaluada por la habilidad de unirse o competir con un polipéptido para unirse a un anticuerpo anti-FVII; habilidad para unir factor de tejido, factor X o factor IX; habilidad para unir a fosfolípidos; vida media; estructura tridimensional; pI; y/o conformación. Entre los polipéptidos FVII modificados acá suministrados se encuentran aquellos que tienen actividad coagulante aumentada. Entre estos se encuentran aquellos cuyo incremento en la actividad coagulante resulta de o involucra resistencia aumentada del FVII modificado a TFPI, resistencia aumentada a AT-III,

178
~~192~~

propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media aumentada, actividad catalítica aumentada, y/o unión aumentada a plaquetas activadas. Los métodos ejemplares para identificar dichos polipéptidos FVII modificados y los polipéptidos modificados se suministran acá. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado que exhibe resistencia aumentada a TFPI, resistencia aumentada a AT-III y/o unión aumentada a las plaquetas activadas puede ser generado racional o empíricamente por: (a) orientación de forma racional de sitios que son contemplados para estar involucrados en dichas propiedades o, (b) probar empíricamente los polipéptidos FVII modificados en ensayos funcionales para la resistencia a TFPI, resistencia a AT-III, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media aumentada, y/o unión mejorada a fosfolípidos o plaquetas activadas. En varios casos, una combinación de aproximaciones de diseño racionales y empíricas puede ser utilizada para generar polipéptidos FVII modificados.

Una vez se identifica un dominio, región o aminoácido para la modificación usando una aproximación racional o empírica, cualquier método conocido en el arte para llevar a cabo la mutación de cualquier aminoácido en una proteína objetivo puede ser empleado. Los métodos incluyen mutagénesis estándar dirigida a sitio (que usa por ejemplo, un kit, tal como un kit tal como QuikChange disponible de Stratagene) de moléculas de ácido nucleico codificador, o por métodos de síntesis de polipéptido de fase sólida. Adicionalmente, las proteínas quiméricas modificadas acá suministradas (es decir, intercambio de dominio Gla) pueden ser generadas por técnicas de ADN

recombinante de rutina. Por ejemplo, los polipéptidos quiméricos pueden ser generados usando enzimas de restricción y metodologías de coagulación para la subclonación de rutina de los componentes de polipéptido quimérico deseados. Una vez identificados y generados, los polipéptidos FVII modificados pueden luego ser evaluados para actividad, tal como actividad catalítica o actividad coagulante, que usan uno o más de varios ensayos conocidos en el arte o descritos más adelante.

1. Racional

En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados acá suministrados son diseñados por modificación racional para aumentar la actividad coagulante. En dicho método, los dominios, regiones o aminoácidos responsables por la actividad de un polipéptido son conocidos o pueden ser determinados racionalmente. Por ejemplo, varias bases de datos en el dominio público suministran información de secuencia y de dominio relacionada con el FVII tipo salvaje (ver, por ejemplo, el servidor ca.expasy.org de ExPASy Proteomics). Otra información en el dominio público puede ser accedida para determinar los aminoácidos, regiones y/o dominios en un polipéptido FVII que están involucrados en una interacción o actividad específica. Dichas fuentes incluyen, por ejemplo, revistas científicas, bases de datos de secuencia y función, o bases de datos de patentes. En algunos casos, la evidencia directa puede ser utilizada para determinar la influencia de uno o más aminoácidos en una interacción o actividad dada. En otros ejemplos, esto es extrapolado de, por ejemplo, evidencia o información relacionada con las proteínas que

muestran actividades y/o interacciones similares. En dichos ejemplos, esos aminoácidos que son responsables por la actividad o interacción en las proteínas relacionada pueden ser utilizados para determinar cuales son los aminoácidos correspondientes en el polipéptido FVII mediante la alineación del polipéptido relacionado con el polipéptido FVII, con base en las similitudes de secuencia y/o estructurales. Por lo tanto, los aminoácidos en el polipéptido FVII que están involucrados en la actividad o interacción dada pueden ser determinados. Adicionalmente, el modelo de homología puede ser utilizado para pronosticar residuos que juegan papeles importantes en la formación y/o estabilización de interacciones de proteína/proteína, y esta información puede ser utilizada para diseñar variantes con propiedades mejoradas.

Una vez se determinan los dominios, regiones y/o aminoácidos responsables por la actividad de un polipéptido FVII, ellos pueden ser modificados de modo tal que las modificaciones son pronosticadas para resultar en actividad coagulante aumentada del polipéptido. Esto puede ser llevado a cabo de varias formas dependiendo de la actividad o interacción que está dirigida. En algunos ejemplos, una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácido pueden ser hechas para incrementar la afinidad del FVII modificado por otras proteínas o moléculas.

En un ejemplo, las modificaciones pueden ser hechas para cualquier dominio, región o aminoácido de modo tal que la afinidad o interacción del FVII modificado por otras proteínas es alterado, es decir aumentado o disminuido dependiendo en la interacción objetivo a ser modificada. Para llevar a cabo

dicha modificación, los dominios, regiones y/o aminoácidos involucrados o contemplados a estar involucrados en dicha interacción son conocidos o pueden ser determinados racionalmente. Por ejemplo, un FVII modificado puede ser diseñado racionalmente para tener una interacción reducida con una proteína inhibitoria, tal como TFPI o AT-III, para aumentar la actividad coagulante del polipéptido FVII modificado. Un método para diseñar racionalmente un polipéptido FVII para tener una interacción reducida con FTPI se establece en el Ejemplo 1. Aproximaciones similares pueden ser desarrolladas para incrementar o reducir la interacción de FVII con cualquier otro polipéptido para el cual el FVII es conocido para interactuar o unirse.

Por ejemplo, el FVII fue modificado para mostrar resistencia aumentada al TFPI. El TFPI, en un complejo con FXa, se une al complejo TF/FVIIa para formar un complejo cuaternario en el cual la actividad catalítica del FVIIa se inhibe. El primer dominio de Kunitz de TFPI-1 (TFPI-1 K1) es el dominio que es responsable por la interacción con, e inhibición de, FVIIa. La identificación de los residuos de aminoácido de FVII que están involucrados en esta interacción facilita el diseño de polipéptidos FVII que son resistentes al TFPI. Varias aproximaciones pueden ser utilizadas para determinar cuales residuos de aminoácidos en FVII están involucrados en esta interacción, incluyendo, pero no limitado a, mutagénesis, aproximaciones de escaneado, y diseño racional tal como modelado por computador. La estructura de cristal del FVIIa en complejo con TFPI puede ser utilizada como base para determinar los residuos de contacto. Alternativamente, y como está descrito en el Ejemplo 1, donde no hay

disponible una estructura de cristal, el modelado por computador puede ser generado a través de una serie de alineaciones y extrapolaciones de estructuras y secuencias conocidas de proteínas relacionadas y sus interacciones entre sí.

Los resultados del modelado por computador pueden ser utilizados para identificar los residuos que están involucrados directamente con una proteína objetivo deseada, tal como por ejemplo, TFPI, y/o aquellos residuos que están involucrados directamente en la interacción, por ejemplo, debido a la proximidad a los residuos de contacto. Por ejemplo, usando los resultados del modelado por computador como se establecen en el Ejemplo 1, una alineación de los primeros dominios de Kunitz de TFPI-1 y TFPI-2 fue realizado para determinar cuales eran los residuos de "contacto" correspondientes en el TFPI-1 (Figura 5b). Los aminoácidos de reemplazo pueden ser identificados con el fin de alterar la interacción del polipéptido FVII con la proteína objetivo. Los aminoácidos de reemplazo pueden ser hasta 19 otros aminoácidos que ocurren naturalmente, así como aminoácidos "no naturales". Alternativamente, dichos aminoácidos de reemplazo pueden ser identificados por mutagénesis *in silico* con base en hipótesis racionales de la interacción. El ejemplo 1 establece una aproximación *in silico* para la identificación de aminoácidos de reemplazo por los cuales el análisis del modelado por computador reveló residuos involucrados en electrostática complementaria entre el Factor FVII y el TFPI-1 K1. Por ejemplo, el D60 cargado negativamente de FVII (por numeración de quimotripsina) parece estar involucrado en una interacción electrostática con el

R20 cargado negativamente de TFPI-1. Este residuo es por lo tanto un candidato para la mutagénesis de modo tal que la complementariedad electrostática con R20 de TFPI es abolida, generando así un polipéptido FVII modificado que tiene resistencia aumentada a TFPI. Esto puede ser efectuado por las sustituciones de inversión de cambio o neutralización de cambio. Por ejemplo, una sustitución de aminoácido puede ser hecha para reemplazar el ácido aspártico cargado negativamente con una lisina cargada positivamente. Dicha sustitución de inversión de cambio establece una interacción repulsiva carga-carga en este sitio, e interfiere con la unión e interacción de TFPI con FVIIa. En otro ejemplo, el D60 cargado negativamente de FVII puede ser reemplazado con una arginina básica para negar la complementariedad electrostática positiva con R20 de TFPI e introducir una interacción desfavorable. Dichas modificaciones diseñadas racionalmente pueden ser hechas a uno o más residuos de FVII que son determinados para estar involucrados en contacto directo o indirecto y la interacción con residuos de TFPI.

En otro ejemplo, las modificaciones racionales de un polipéptido FVII pueden ser hechas con base en funciones conocidas de dominios o regiones del polipéptido. Por ejemplo, el dominio Gla de FVII es conocido por ser responsable por la unión de FVIIa a fosfolípidos, tales como aquellos mostrados en las plaquetas activadas, aunque muy débilmente. Otras proteínas dependientes de vitamina K, tales como por ejemplo, FIX, FX, protrombina, proteína C y proteína S, también poseen dominios Gla para efectuar la unión

184
199

de la proteína a los fosfolípidos cargados negativamente, en varios casos con una afinidad mucho mayor que la del dominio Gla del FVII. La introducción de un dominio Gla heterólogo en un polipéptido FVII es contemplada para aumentar la afinidad del FVII por los fosfolípidos, en comparación con aquel de FVII (y FVIIa). Por lo tanto, en un ejemplo, el dominio Gla de FX, o una porción suficiente del dominio Gla de FX para efectuar la unión de fosfolípidos, puede ser introducida en un polipéptido FVII para generar un polipéptido FVII modificado quimérico.

Si es necesario, una combinación de métodos racionales y empíricos puede ser utilizada para diseñar un polipéptido FVII. Por ejemplo, la unión de polipéptidos que contiene dominio Gla puede ser probada y controlada para identificar cuales polipéptidos exhiben la más alta unión y/o afinidad a fosfolípidos, tal como por ejemplo, en superficies de plaquetas. Alternativamente o adicionalmente, una serie de polipéptidos FVII que contienen introducción de varios dominios Gla heterólogos, o porciones suficientes de los mismos, pueden ser probados para determinar cuales polipéptidos quiméricos exhiben la más alta afinidad y/o unión a fosfolípidos.

2. **Empírico (es decir, proyección)**

Los polipéptidos FVII modificados también pueden ser generados empíricamente y luego probados o controlados para identificar aquellos que tienen la actividad o propiedad particular contemplada. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados pueden ser generados por medio la mutación de uno o más residuos de aminoácido de un polipéptido FVII usando cualquier

método comúnmente conocido en el arte (ver también la solicitud de EEUU publicada No. 2004/0146938). Dichos polipéptidos FVII modificados pueden ser probados en ensayos funcionales de coagulación para determinar si ellos son "Éxitos" para aumentar la actividad coagulante. Los éxitos pueden ser además probados para determinar si ellos muestran resistencia aumentada a inhibidores tales como TFPI o AT-III y/o visualizar unión aumentada a fosfolípidos o propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media aumentada, usando cualquiera de los ensayos acá descritos o conocidos para los expertos en la materia.

Los ejemplos de métodos para mutar FVII incluyen métodos que resultan en una mutagénesis aleatoria a lo largo de toda la secuencia o métodos que resultan en mutagénesis enfocada de una región o dominio selecto de la secuencia de FVII. En un ejemplo, el número de mutaciones hechas al polipéptido es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 o más.

a. **Mutagénesis Aleatoria**

Cualquier variedad de las aproximaciones generales para la evolución de la proteína dirigida con base en mutagénesis puede ser empleada. Cualquiera de estas, sola o en combinación puede ser utilizada para modificar un polipéptido tal como FVII para lograr una propiedad deseada. Dichos métodos incluyen mutagénesis aleatoria, donde los aminoácidos en la secuencia de proteína inicial son reemplazados por todos (o un grupo) de 20 aminoácidos naturales (así como amino ácidos no naturales) bien sea en

reemplazos simples o múltiples en diferentes posiciones de aminoácido en la misma molécula, al mismo tiempo. Otro método, mutagénesis aleatoria restringida, introduce bien sea todos o algunos de los 20 aminoácidos naturales (así como aminoácidos no naturales) o residuos parciales de ADN. La parcialidad se basa en la secuencia del ADN y no en la de la proteína en una forma estocástica o semi-estocástica, respectivamente, dentro de regiones restringidas o predefinidas de la proteína conocida en avance para estar involucrada en la actividad biológica que es "evolucionada". Métodos ejemplares para modificar una proteasa se describen en la Solicitud de EEUU No. 10/677,977, incorporada acá por referencia es su totalidad. Adicionalmente, cualquier método conocido en el arte puede ser utilizado para modificar o alterar una secuencia de polipéptido de proteasa, tal como un polipéptido FVII de proteasa.

Los métodos de mutagénesis aleatoria incluyen, por ejemplo, el uso de *E. coli* XL1red, radiación UV, modificación química tal como por desaminación, alquilación, o mutágenos análogos base, o métodos PCR tales como arrastramiento de ADN, mutagénesis de cinta, mutagénesis aleatoria dirigida de sitio, o propenso al error PCR (ver por ejemplo, la Solicitud de EEUU No.: 2006-0115874). Dichos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, modificación química por hidroxilamina (Ruan, H., *et al.* (1997) *Gene* 188:35-39), el uso de dNTP análogos (Zaccolo, M., *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 255:589-603), o el uso de kits de mutagénesis aleatoria disponibles comercialmente tales como, por ejemplo, kits GeneMorph de mutagénesis aleatoria basados en PCR

(Stratagene) o kits de mutagénesis aleatoria de Diversificación (Clontech). Los kits de mutagénesis aleatoria de Diversificación permiten la selección de una tasa de mutación deseada para una secuencia de ADN dada (desde 2 hasta 8 mutaciones/1000 pares base) mediante la variación de las cantidades de manganeso (Mn^{2+}) o dGTP en la mezcla de reacción. Elevar los niveles de manganeso inicialmente aumenta la tasa de mutación, con un incremento adicional de tasa de mutación suministrado mediante el aumento de la concentración de dGTP. Se pueden alcanzar tasas de mutación aún más altas mediante el desarrollo de rondas adicionales de PCR.

b. **Mutagénesis Enfocada**

La mutación enfocada puede ser lograda haciendo una o más mutaciones en una región predeterminada de una secuencia de gen, por ejemplo, en regiones del dominio de proteasa que media la actividad catalítica, las regiones del dominio Gla que se unen a los fosfolípidos, las regiones del polipéptido FVII que unen inhibidores o moléculas tales como TFPI, AT-III o Zn^{2+}, tales como aquellos acá suministrados, o regiones de la proteína que interactúa con los factores o receptores involucrados en el aclaramiento de FVIIa, tales como aquellos acá suministrados. En un ejemplo, uno o más aminoácidos de un polipéptido que son mutados usando cualquier kit de mutagénesis estándar simple o múltiple dirigida a sitio tal como por ejemplo QuikChange (Stratagene). En otro ejemplo, uno o más aminoácidos de una proteasa son mutados por medio de la mutagénesis de saturación (Zheng *et al.* (2004) *Nucl. Acids Res.*, 32:115). En una modalidad ejemplar, una técnica de

mutagénesis de saturación es usada en la cual los residuos de una región o dominio son mutados a cada uno de los 20 posibles aminoácidos naturales (así como los aminoácidos no naturales) (ver por ejemplo el método Kunkle, Protocolos Actuales en Biología Molecular, John Wiley e Hijos, Inc., Media, Pa.). En dicha técnica, un primer oligonucleótido mutagénico degenerado puede ser sintetizado el cual contiene la aleatorización de nucleótidos en los codones deseados que codifican los aminoácidos seleccionados. Los esquemas de aleatorización ejemplares incluyen aleatorización NNS o NNK, donde N representa cualquier nucleótido, S representa guanina o citosina y Ka representa guanina o timina. El primer mutagénico degenerado es recocido a la plantilla de ADN de cadena simple y la polimerasa de ADN es adicionada para sintetizar la cadena complementaria de la plantilla. Después de la ligadura, la plantilla de ADN de cadena doble es transformara en *E. coli* para la amplificación.

En un ejemplo adicional, la mutagénesis enfocada puede ser restringida a aminoácidos que son identificados como puntos clave en las rondas iniciales de proyección. Por ejemplo, después de la selección de polipéptidos FVII modificados de librerías combinatoriales mutagenizadas aleatoriamente, un número desproporcionado de mutaciones puede ser observado en posiciones o regiones específicas. Estos son designados como "puntos clave", y pueden ser observados a través de más de una ronda de mutagénesis y proyección. Los ensayos funcionales pueden luego ser llevados a cabo en los polipéptidos FVII modificados para determinar si las mutaciones en los puntos clave se

correlacionan con una o más propiedades o actividades deseadas. Si la correlación entre los puntos clave y la actividad o propiedad deseada se verifica, la mutagénesis enfocada puede entonces ser utilizada para centrarse específicamente en estos puntos clave para la mutagénesis adicional. Esta estrategia permite una mutagénesis más diversa y profunda en posiciones específicas particulares, opuesto a la mutagénesis menos profunda que ocurre después de la mutagénesis aleatoria de una secuencia de polipéptido. Por ejemplo, la mutagénesis de saturación puede ser utilizada para mutar los "puntos clave" tales como mediante el uso de oligos que contienen NNt/g o NNt/c en estas posiciones.

c. **Proyección**

`Los polipéptidos modificados pueden ser probados en ensayos de proyección de forma individual, o pueden ser probados como colecciones tales como en librerías. En un ejemplo, los polipéptidos variante FVII son generados aleatoriamente por mutagénesis, y clonados individualmente. La evaluación de actividad es luego llevada a cabo de forma individual en cada molécula mutante de proteína individual, seguido a la expresión de proteína y la medición de la actividad apropiada. En algunos ejemplos, los clones individuales pueden ser evaluados en un arregle direccionable, de modo tal que ellos están físicamente separados entre sí de modo que la identidad de cada polipéptido individual es conocida con base en su ubicación en el arreglo. Por ejemplo, si cada uno es un producto simple o una reacción de mutagénesis independiente, la mutación específica puede ser determinada fácilmente sin la necesidad de secuenciar.

190-190

205

Alternativamente, la secuencia puede ser llevada a cabo en los polipéptidos modificados resultantes para determinar esas mutaciones que confieren una actividad.

En otro ejemplo, los polipéptidos FVII modificados pueden ser controlados como colecciones o en una librería. Por ejemplo, una librería de polipéptidos FVII puede ser mostrada en un paquete genético para la proyección, incluyendo, pero no limitado a cualquier vector replicable, tal como un fago, virus, o bacteria, que puede mostrar una porción de polipéptido. La pluralidad de polipéptidos mostrados es mostrada por un paquete genético en una forma tal que permite al polipéptido unirse y/o interactuar con un polipéptido objetivo. Los paquetes genéticos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos (ver, por ejemplo, Clackson et al. (1991) Making Antibody Fragments Using Phage Display Libraries, *Nature*, 352:624-628; Glaser et al. (1992) Antibody Engineering by Condon-Based Mutagenesis in a Filamentous Phage Vector System, *J. Immunol.*, 149:3903 3913; Hoogenboom *et al.* (1991) Multi-Subunit Proteins on the Surface of Filamentous Phage: Methodologies for Displaying Antibody (Fate) Heavy and 30 Light Chains, *Nucleic Acids Res.*, 19:4133-41370), baculoviruses (see, *e.g.*, Boublik et al. (1995) Eukaryotic Virus Display: Engineering the Major Surface Glycoproteins of the Autographa California Nuclear Polyhedrosis Virus (ACNPV) for the Presentation of Foreign Proteins on the Virus Surface, *Bio/Technology*, 13:1079-1084), bacterias y otros vectores adecuados para la visualización de una proteína, tal como una proteasa visualizada de fago. Por ejemplo, los

1910
191

bacteriófagos de interés incluyen, pero no se limitan a, fago T4, fago M13 y fago H1. Los paquetes genéticos son amplificados opcionalmente tal como en una bacteria huésped.

La visualización de fago es conocida para aquellos expertos en la materia y se describe, por ejemplo en Ladner *et al.*, Solicitud de Patente de EEUU No. 5,223,409; Rodi *et al.* (2002) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6:92-96; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; de Haard *et al.* (1999) *J. Biol. Chem* 274:18218-30; Hoogenboom *et al.* (1998) Immunotechnology 4:1-20; Hoogenboom *et al.* (2000) Immunol Today 2:371-8; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Rebar *et al.* (1996) *Methods Enzymol.* 267:129-49; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; y Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982. Los ácidos nucleicos adecuados para la visualización de fago, por ejemplo, vectores de fago, son conocidos en el arte (ver, por ejemplo, Andris-Widhopf *et al.* (2000) *J Immunol Methods*, 28: 159-81, Armstrong *et al.* (1996) Academic Press, Kay *et al.*, Ed. pp.35-53; Corey *et al.* (1993) *Gene* 128(1):129-34; Cwirla *et al.* (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87(16):6378-82; Fowlkes *et al.* (1992) *Biotechniques* 13(3):422-8; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19(15):4133-7;

191
192

McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348(6301):552-4; McConnell *et al.* (1994) *Gene* 151(1-2):115-8; Scott y Smith (1990) *Science* 249(4967):386-90).

Las librerías de polipéptidos FVII variantes para la proyección también pueden ser expresadas en las superficies de células, por ejemplo, células procarióticas y eucarióticas. Células ejemplares para la expresión de superficie celular incluyen, pero no se limitan a, bacteria, levadura, células de insecto, células de aves, células de plantas, y células de mamíferos (Chen y Georgiou (2002) *Biotechnol Bioeng* 79: 496-503). En un ejemplo, las células bacteriales para la expresión son *Escherichia coli.*

Los polipéptidos variantes pueden ser expresados como una proteína de fusión con una proteína que está expresada en la superficie de la célula, tal como una proteína de membrana o una proteína asociada a la superficie celular. Por ejemplo, una proteasa variante puede ser expresada en *E. coli* como una proteína de fusión con una proteína de membrana externa de *E. coli* (por ejemplo OmpA), una molécula híbrida manipulada o modificada genéticamente de la lipoproteína principal de *E. coli* (Lpp) y la OmpA de proteína de membrana externa o una proteína asociada a la superficie celular (por ejemplo subunidades pili y flagelar). Generalmente, cuando las proteínas de membrana externa bacterial son usadas para la visualización de péptidos heterólogos o proteínas, esto se logra a través de la inserción genética en sitios permisivos de las proteínas portadoras. La expresión de un péptido heterólogo o proteína es dependiente de las propiedades estructurales del dominio de proteína insertada, toda vez que el péptido o proteína es más limitado cuando

se inserta en un sitio permisivo en comparación con la fusión en el término N o C de una proteína. Las modificaciones a la proteína de fusión pueden ser hechas para mejorar la expresión de la proteína de fusión, tal como la inserción del vinculador flexible de péptido o secuencias espaciadoras o modificación de la proteína bacterial (por ejemplo, por mutación, inserción o supresión, en la secuencia de aminoácido). Las enzimas, tales como β-lacatamasa y la exoglucanasa Cex de *Cellulomonas fimi*, han sido expresadas exitosamente como proteínas de fusión Lpp-OmpA en la superficie de *E. coli* (Francisco J.A. y Georgiou G. *Ann N Y Acad Sci.* 745:372–382 (1994) y Georgiou G. *et al. Protein Eng.* 9:239–247 (1996)). Otros péptidos de 15-514 aminoácidos han sido mostrados en el segundo, tercero, y cuarto bucle externo en la superficie de OmpA (Samuelson et al. *J. Biotechnol.* 96: 129-154 (2002)). Por lo tanto, las proteínas de membrana externa pueden llevar y mostrar los productos heterólogos de genes en la superficie exterior de la bacteria.

También es posible usar otros formatos de visualización para controlar librerías de polipéptidos variantes. Los ejemplos de otros formatos de visualización incluyen fusiones de proteína de ácido nucleico, visualización de ribozima (ver por ejemplo, Hanes and Pluckthun (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 13:4937-4942), visualización de cordón (Lam, K. S. *et al.* Nature (1991) 354, 82-84; , K. S. *et al.* (1991) *Nature*, 354, 82-84; Houghten, R. A. *et al.* (1991) *Nature*, 354, 84-86; Furka, A. *et al.* (1991) *Int. J. Peptide Protein Res.* 37, 487-493; Lam, K. S., *et al.* (1997) *Chem. Rev.*, 97, 411-448; Solicitud de Patente de EEUU Publicada 2004-0235054) y arreglos de proteína (ver por

193
194
204

ejemplo, Cahill (2001) *J. Immunol. Meth.* 250:81-91, WO 01/40803, WO 99/51773, y US2002-0192673-A1).

En otros casos específicos, puede ser ventajoso adjuntar de forma contraria los polipéptidos variantes o librerías de fagos o células que expresan polipéptidos variantes a un soporte sólido. Por ejemplo, en algunos ejemplos, las células que expresan polipéptidos FVII variantes pueden ser absorbidas naturalmente a un cordón, de modo tal que una población de cordones contiene una célula simple por cordón (Freeman *et al.* Biotechnol. Bioeng. (2004) 86:196-200). Seguido a la inmovilización a un soporte de vidrio, las microcolonias pueden ser crecidas y controladas con un sustrato cromogénico o fluorogénico. En otro ejemplo, los polipéptidos FVII variantes o librerías de fago o células que expresan proteasas variantes pueden ser arreglados en placas de título e inmovilizados.

Para identificar esos polipéptidos FVII modificados que exhiben actividad coagulante aumentada, los polipéptidos FVII modificados son controlados individualmente o en una librería y probados en ensayos funcionales para identificar aquellos que muestran resistencia aumentada a los inhibidores tales como TFPI y AT-III, unión aumentada a las plaquetas activadas de fosfolípidos, vida media aumentada y/o mostrar actividad catalítica aumentada. Dichos ensayos son acá descritos o son conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados son probados para actividad proteolítica. Los polipéptidos FVII, solos o en presencia de TF, son incubados con concentraciones variantes de sustrato cromogénico, tal como el sustrato

peptidil Spectrozima FVIIa (CH_3SO_2-D-CHA-But-Arg-pNA.AcOH). La ruptura del sustrato es monitoreada mediante la absorbencia y la tasa de hidrólisis de sustrato determinada por la regresión lineal usando un programa de computador disponible fácilmente. En un ejemplo adicional, la resistencia de polipéptidos FVII modificados a TFPI o AT-III es evaluada por la incubación del inhibidor con polipéptidos FVII que, en algunos casos, han sido preincubados con TF. La actividad de FVII es luego medida usando uno o más de los ensayos de actividad o coagulación de polipéptidos FVII incubados con el inhibidor, con la actividad de polipéptidos FVII que no fueron incubados con el inhibidor.

La mutación específica del polipéptido candidato puede ser determinada usando técnicas de rutina de ADN recombinante, tal como la secuencia. En una modalidad, las combinaciones de "Aciertos" pueden ser hechas para incrementar las propiedades y/o actividades coagulantes del polipéptido FVII modificado.

3. Selección de variantes FVII

Las variantes de polipéptido FVII diseñadas e identificadas por una o más de las aproximaciones descritas anteriormente, pueden ser seleccionadas para identificar aquellos polipéptidos FVII candidatos que exhiben las propiedades o actividades deseadas. La selección de los polipéptidos FVII variantes se basa en 1) primero, probar el polipéptido variante para la actividad o propiedad específica que es modificada (es decir, resistencia a TFPI, resistencia a AT-III, unión de Zn^{2+}, actividad catalítica, vida media, unión y/o

afinidad por fosfolípidos; y 2) segundo, probar el polipéptido variante para la retención de un a actividad de FVII requerida para la hemostasia y la coagulación. Incluidas entre las actividades de FVII que son requeridas para la coagulación se incluye, por ejemplo, actividad enzimática, proteolítica o catalítica tal como para efectuar la activación de factor X (FX) o la activación de factor IX (FIX). Otras actividades de FVII que pueden ser evaluadas incluyen, pero no se limitan a, antigenicidad, la habilidad para unir factor de tejido, factor X o factor IX, y la habilidad para unirse a fosfolípidos. Por lo tanto, un polipéptido FVII modificado, tal como cualquiera acá suministrado o identificado en los métodos acá proporcionados, debe retener algún nivel, bien sea aumentado o disminuido, de una actividad de FVII requerida para la actividad coagulante. Los ensayos estándar conocidos en el arte o descritos acá a continuación pueden ser llevados a cabo *in vitro* o *in vivo* con el fin de desarrollar cada una de las dos evaluaciones anteriores. Por ejemplo, la actividad proteolítica o catalítica del FVII puede ser evaluada usando varios métodos, incluyendo la medición de la ruptura de un sustrato sintético, la medición de la activación del factor X (ver, por ejemplo, los Ejemplos 4, 5 y 11 más adelante), y la resistencia a TFPI o AT-II puede ser evaluada mediante el ensayo para la inhibición por TFPI o AT-II, respectivamente (ver, por ejemplo, los Ejemplos 7, 12 y 6). Adicionalmente, los ensayos *in vivo* para la actividad procoagulante, tal como se ha descrito, por ejemplo, en los Ejemplos 8 y 14 también puede ser empleada.

El efecto total de cualquier variante de polipéptido FVII candidato es para exhibir una actividad procoagulante. Por ejemplo, un polipéptido variante puede ser aumentado en su resistencia a TFPI, resistencia a AT-III, vida media y/o unión y/o afinidad por fosfolípidos, mientras que también exhibe un incremento en la actividad catalítica. Dicho polipéptido FVII sería seleccionado como una variante de FVII candidata para aumentar la actividad coagulante.

En algunos casos, sin embargo, un polipéptido FVII modificado para tener actividad coagulante mejorada debido a una o más de resistencia aumentada a TFPI, resistencia aumentada a AT-III, vida media aumentada o unión y/o afinidad aumentada por fosfolípidos, puede también exhibir una reducción en la actividad catalítica u otra actividad requerida para la coagulación como resultado de la modificación particular. Estos efectos podrían resultar de, por ejemplo, los cambios conformacionales en los polipéptidos FVII modificados que interfieren con la unión a otra molécula, los cambios conformacionales que resultan en un sitio activo alterado, o sustituciones de aminoácido que involucran directamente uno o más residuos de aminoácido que son responsables por la interacción con otra molécula.

Por lo tanto, en otro ejemplo, un polipéptido variante que es incrementado en su resistencia TFPI, resistencia a AT-III, vida media aumentada y/o afinidad por fosfolípidos puede exhibir una reducción concomitante en su actividad catalítica. El nivel de reducción en una actividad de FVII, tal como una actividad catalítica, que sería aceptable para asegurar la actividad coagulante mejorada es dependiente del incremento concomitante en

198

la propiedad que está siendo modificada para la mejora (es decir, la resistencia aumentada a TFPI), y puede ser determinada empíricamente. Por lo tanto, los resultados de dichas evaluaciones establecidas anteriormente pueden ser balanceados para identificar esos polipéptidos variantes que exhiben propiedades mejoradas, mientras que al mismo tiempo retienen al menos una actividad FVII suficiente, es decir actividad catalítica, para efectuar la coagulación. Típicamente, entre más grande es el incremento en la propiedad contemplada para la modificación (es decir, mayor que sea el incremento en la resistencia a TFPI), mayor será la reducción aceptable en la actividad proteolítica catalítica.

Por ejemplo, un polipéptido FVII que exhibe un aumento en 100 dobleces en la resistencia a TFPI o AT-III puede exhibir una reducción en la actividad proteolítica o catalítica que es reducida en o aproximadamente 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 dobleces o más en comparación con la actividad de un polipéptido FVII no modificado, y seguiría siendo un candidato viable para aumentar la actividad coagulante. Al contrario, si la resistencia a TFPI o AT-III se aumenta por 10 dobleces, el nivel de reducción en la actividad catalítica para mantener una actividad procoagulante total sería típicamente una reducción de o aproximadamente 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más dobleces en comparación con la actividad catalítica de un polipéptido no modificado. Un experto en la materia puede evaluar los cambios concomitantes en la resistencia de TFPI, resistencia de AT-III, unión de plaquetas activadas, vida media y actividad proteolítica o catalítica, o cualquier

otra actividad o propiedad, para determinar si el polipéptido FVII modificado sería útil como un terapéutico procoagulante, tal como, por ejemplo, para tratar episodios de sangrado en pacientes con hemofilia.

F. Producción de polipéptidos FVII

Los polipéptidos FVII, incluyendo los polipéptidos FVII modificados, o dominios de los mismos de FVII u otros polipéptidos de vitamina K, pueden ser obtenidos por métodos bien conocidos en el arte por purificación de proteína y expresión de proteína recombinante. Cualquier método conocido por los expertos en la materia para la identificación de ácidos nucleicos que codifican genes deseados pueden ser utilizados. Cualquier método disponible en el arte puede ser utilizado para obtener un cADN de longitud completa (es decir, que mantiene la totalidad de la región codificante) o clon de ADN genómico que codifica un polipéptido FVII u otro polipéptido de vitamina K, tal como a partir de células o fuente de tejido, tal como por ejemplo de hígado. Los polipéptidos FVII modificados pueden ser manipulados o modificados como acá se describe, tal como por mutagénesis dirigida de sitio.

El FVII puede ser clonado o aislado usando cualquier método disponible conocido en el arte para la clonación y asilamiento de moléculas de ácido nucleico. Dichos métodos incluyen amplificación de PCR de ácidos nucleicos y control de librerías, incluyendo proyección de hibridación de ácido nucleico, proyección con base en anticuerpo y proyección con base en la actividad.

Los métodos para la amplificación de ácidos nucleicos pueden ser utilizados para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido

200
199

FVII, incluyendo, por ejemplo, métodos de reacción de cadena de polimerasa (PCR). Un material que contiene ácido nucleico puede ser utilizado como un material de inicio a partir del cual una molécula de ácido nucleico que codifica FVII puede ser aislado. Por ejemplo, las preparaciones de ADN y mARN, extractos de célula, extractos de tejido (por ejemplo, de hígado), muestras de fluido (por ejemplo, sangre, suero, saliva), muestras de sujetos sanos y/o enfermos pueden ser utilizados en métodos de amplificación. Las librerías de ácido nucleico también pueden ser utilizadas como una fuente de material de inicio. Los primeros pueden ser diseñados para amplificar una molécula codificante de FVII. Por ejemplo, los primeros pueden ser diseñados con base en una traducción posterior de una secuencia de aminoácido de FVII. Las moléculas de ácido nucleico generadas por amplificación pueden ser secuenciadas y confirmadas para codificar un polipéptido FVII.

Las secuencias de nucleótido adicionales pueden ser unidas a una molécula de ácido nucleico que codifica FVII, que incluye secuencias vinculadoras que contienen sitios de endonucleasa de restricción para el propósito de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteína o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias funcionales de ADN de proteína de núcleo. Además, las secuencias adicionales de nucleótido que especifican los elementos de ADN funcional pueden estar vinculadas operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica FVII. Ejemplos de dichas secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de proteína

201
200
216

intracelular, y la secreción de secuencias diseñadas para facilitar la secreción de proteína. Secuencias adicionales de nucleótido tales como las secuencias que especifican las regiones de unión de proteína pueden ser vinculadas a las moléculas de ácido nucleico que codifica FVII. Dichas regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias para facilitar la captación de FVII en células específicas objetivo, o de otra forma para mejorar la farmacocinética del gen sintético.

Los ácidos nucleicos identificados y aislados pueden luego ser insertados en un vector de clonación apropiado. Un gran número de sistemas de vector huésped conocidos en el arte pueden ser utilizados. Los posibles vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula huésped utilizada. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como derivados plásmidos de pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). La inserción en un vector de clonación puede, por ejemplo, ser ejecutado mediante la ligación del fragmento de ADN en un vector de clonación el cual tiene Termini de cohesión complementario. La inserción puede ser efectuada usando vectores de clonación TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios utilizados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden ser modificados de forma enzimática. Alternativamente, cualquier sitio deseado puede ser producido mediante la ligación de secuencias (vinculadotes) de

202
204
917

nucleótidos en el Termini de ADL; estos vinculadotes ligados pueden contener oligonucleótidos específicos sintetizados químicamente que codifican secuencias de restricción de reconocimiento de endonucleasa. En un método alterno, el vector roto y el gen de proteína de FVII puede ser modificado mediante la terminación de ADN homopolimérica. Las moléculas recombinantes pueden ser introducidas en células huésped por medio de, por ejemplo, la transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo tal que se generan varias copias de la secuencia de gen.

En modalidades específicas, la transformación de las células huésped con las moléculas recombinantes de ADN que incorporan el gen de proteína de FVII aislado, cADN, o la secuencia de ADN sintetizado habilita la generación de múltiples copias del gen. Por lo tanto, el gen puede ser obtenido en grandes cantidades mediante el crecimiento de transformantes, aislamiento de las moléculas de ADN recombinante a partir de los transformantes y, cuando sea necesario, la recuperación del gen insertado a partir del ADN recombinante aislado.

1. Vectores y Células

Para la expresión recombinantes de una o más de las proteínas de FVII, el ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia de nucleótido que codifica la proteína de FVII puede ser insertada en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia que codifica la proteína insertada.

203
202

Ejemplo de dicho vector es cualquier vector mamífero de expresión tal como, por ejemplo, pCMV. Las señales de transcripción y traducción necesarias también pueden ser suministradas por el promotor nativo para un gen FVII, y/o sus regiones de acompañamiento.

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

Se suministran las células procarióticas y eucarióticas, incluyendo las células endoteliales, que contienen los vectores. Dichas células incluyen células bacteriales, células de levadura, células de hongos, Archea, células de plantas, células de insectos y células animales. Las células son utilizadas para producir un polipéptido FVII o polipéptido FVII modificado del mismo por medio del crecimiento de las células anteriormente descritas bajo condiciones en las cuales la proteína FVII codificada se expresa por la célula, y la recuperación de la proteína FVII expresada. Para propósitos de acá, el FVII puede ser secretado en el medio.

En una modalidad, los vectores que contienen una secuencia de nucleótidos del polipéptido FVII que tiene actividad de FVII y contiene todo o una porción del polipéptido FVII, o múltiples copias del mismo, son suministrados. Los vectores pueden ser seleccionados para la expresión del polipéptido FVII o polipéptido FVII modificado del mismo en la célula o de modo tal que la proteína FVII se expresa como una proteína secretada. Cuando el

204
~~203~~

FVII es expresado el ácido nucleico es vinculado al ácido nucleico que codifica una señal de secreción, tal como la secuencia de señal de factor de apareamiento α *Saccharomyces cerevisiae* o una porción del mismo, o la secuencia de señal nativa.

Una variedad de los sistemas de vector huésped puede ser utilizada para expresar la secuencia que codifica la proteína. Estos incluyen pero no se limitan a sistemas de células mamíferas infectadas con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus u otros virus); sistemas de células de insectos infectadas con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levadura que contiene vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN plásmido, o ADN cósmico. Los elementos de expresión de vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiente del sistema de vector huésped utilizado, cualquier número de elementos adecuados de transcripción y traducción puede ser utilizado.

Cualquier método conocido para aquellos expertos en la materia para la inserción de fragmentos de ADN en un vector puede ser utilizado para construir vectores de expresión que contienen un gen quimérico que contiene señales de control apropiadas de transcripción/traducción y secuencias que codifican la proteína. Estos métodos pueden incluir ADN recombinante *in vitro*, y técnicas de síntesis y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifica un polipéptido FVII o polipéptido FVII modificado, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos del mismo, pueden ser regulados por una segunda secuencia de ácido nucleico para que los genes

205
~~204~~
220

o fragmentos de los mismos se expresen en una serie transformada con la o las moléculas de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede ser controlada por un promotor/potenciador conocido en el arte. En una configuración particular, el promotor no es nativo de los genes para una proteína FVII. Los promotores que pueden utilizarse incluyen pero no se limitan al promotor temprano SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290:304-310 (1981)), el promotor contenido en el terminal largo 3 del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al de la célula 22:787-197 (1980)), el promotor de la timidina quinasa del herpes (Wagner et al, Proc. Natl.. Acad. EE.UU. 75:1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster, et al., Nature 296:39-42 (1982)), los vectores de expresión procarióticos como el promotor de β-lactamasas (Jay et al., (1981) Proc. Natl.. Acad. EE.UU. 75:5543) o el promotor tac (DeBoer et al, Proc. Natl.. Acad. EE.UU. 50:21-25 (1983)), véase también "proteínas útiles de bacterias recombinantes": en la revista Scientific American 242:79-94 (1980)), los vectores de expresión de plantas que contienen el promotor de la nopalina sintetasa (Herrar-Estrella et al, Nature 303:209-213 (1984)) o el virus promotor del mosaico de la coliflor 35S del RNA (Garder et al, Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la fotosintética de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al, Nature 370:115-120 (1984)); elementos promotores de levaduras y otros hongos, como el promotor Gal4, el promotor del alcohol deshidrogenasa, el promotor de la cinasa fosfoglicerol, el promotor de fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de transcripción de animales de control que muestran la

204
205
271

especificidad tisular y se han utilizado en animales transgénicos: la elastasa I región de control del gen que actúa en las células acinares pancreáticas (Swift et al, Cell 35:639-646 (1984); Ornitz et al, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.. 50:399-409 (1986); MacDonald, Hepatología 7:425-515 (1987)); genes de la región de control de la insulina que actúa en las células beta pancreáticas (Hanahan et al, Nature 375:1 15-122 (1985)), la región del gen de la inmunoglobulina de control que está activo en las células linfoides (Grosschedl et al, Cell 35:647-658 (1984), Adams et al, Nature 375:533-538 (1985), Alexander et al, Ministerio del Interior Cell Biol. 7:1436-1444 (1987)), la región del tumor mamario del ratón de control de virus que está activo en las células testuculares, de mama, linfoide y mastocitas (Leder et al., Cell 45:485-495 (1986)), la región del gen de la albúmina de control que está activo en el hígado (Pinckert et al, Genes y Desarrollo. 7:268-276 (1987)), la región de control del gen de alfa-fetoproteína que está activo en el hígado (Krumlauf et al, Ministerio del Interior Cell Biol 5:1639-1648 (1985) ; Hammer et al, Science 235:53-58 1987)), la región de control de los genes alfa-1 antitripsina que está activa en el hígado (Kelsey et al, Genes y Desarrollo 7:161-171 (1987)), la región de control de los genes de la globina beta que está activa en las células mieloides (Mogram et al, Nature 375:338-340 (1985); Kollias et al, Cell 45:89-94 (1986)), la región de control del gen de mielina básica que está activa en las células de oligodendrocitos del cerebro (Readhead et al, Cell 48:703-112 (1987)), la región de control de la cadena de genes ligera de la miosina-2 que está activa en el músculo esquelético (Sani, Nature 314:283-286 (1985)), y la región de

207

206

control del gen de liberación de las hormonas gonadotropinas que está activa en los gonadotrofos del hipotálamo (Mason et al, Science 234:1372-1378 (1986)).

En una configuración particular, se utiliza un vector que contiene un promotor unido operativamente a los ácidos nucleicos que codifica un polipéptido FVII o polipéptido FVII modificado, o un dominio, fragmento, homólogo o derivados del mismo artículo, uno o varios orígenes de replicación y, opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia a los antibióticos). Los vectores y sistemas para la expresión de polipéptidos FVII incluyen los vectores *Pichia* (disponibles, por ejemplo, en Invitrogen, San Diego, CA), en particular los destinados a la secreción de las proteínas codificadas. Los vectores ejemplares del plásmido de expresión en células de mamíferos, por ejemplo, pCMV. Los vectores ejemplares del plásmido para la transformación de células de *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión PQE (disponible en Qiagen, Valencia, CA, véase también la literatura publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores PQE tienen un promotor de fago T5 (reconocido por *E. coli* RNA polimerasa) y un modulo doble de represión del operador lac para proporcionar una expresión estrictamente regulada y de alto nivel de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión de síntesis ribosomal (RBS II) para una traducción eficaz, una secuencia de codificación de etiqueta 6XHis, t_0 y terminaciones de transcripción T1, origen de replicación ColEI, y un gen de beta-lactamasas que confiere resistencia a la ampicilina. Los vectores de PQE

200
207

permiten la colocación de una etiqueta 6xHis en cualquiera de las terminales N- o C de las proteínas recombinantes. Dichos plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30, y pQE 31 que proveen múltiples sitios de clonación para los tres marcos de lectura y facilitan la expresión de las proteinas N-terminal 6xHis. Otros vectores ejemplares de plásmido para la transformación de células de *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, la patente de EE.UU. 4.952.496, disponible desde Novagen, Madison, WI, véase también la bibliografía publicada por Novagen de la descripción del sistema). Dichos plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T71ac, el terminador T7, el operador inducible *E. coli*, y el gen represor lac pET; el pET 12a-c, que contiene el promotor T7, el terminador T7, y la señal de secreción *E. coli* ompT, y el pET 15b y el pET19b (Novagen, Madison, WI), que contienen una secuencia líder His-Tag ™ para su uso en la depuración con una columna y un sitio de su disociación de la trombina, que permite la división de purificación sobre la columna, la región T7 del promotor lac y el terminador T7.

2. **Sistemas de expresión**

Los polipéptidos FVII (modificados y sin modificar) pueden ser producidos por cualquier método conocido en el arte de producción de proteínas en particular en los métodos *in vitro* e *in vivo*, como, por ejemplo, la introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican al FVII en una célula hospedadora, animal huésped y la expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican al FVII *in vitro*. Los polipéptidos FVII y FVII modificados pueden expresarse en cualquier otro organismo adecuado para producir las cantidades

requeridas y las formas de un polipéptido FVII necesario para la administración y el tratamiento. Los anfitriones de expresión incluyen organismos procariotas y eucariotas, como la *E. coli*, la levadura, plantas, células de insecto, células de mamíferos, incluyendo líneas de células humanas y animales transgénicos. Los anfitriones de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas, así como los tipos de modificaciones post-traduccionales que están presentes en las proteínas expresadas. La elección del huésped de expresión se puede hacer sobre la base de estos y otros factores, como las consideraciones de regulación y de seguridad, los costes de producción y de la necesidad y los métodos de purificación.

La expresión en anfitriones eucariotas puede incluir la expresión en levaduras, como Saccharomyces cerevisiae y Pichia Pastoría, células de insecto como las células de la Drosophila y células de lepidópteros, las plantas y células de las plantas como el tabaco, maíz, arroz, algas y Lemna. Las células eucariotas de expresión también incluyen las líneas de células de mamíferos como el de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón de hámster bebé (BHK). Los anfitriones de expresión eucariotas también incluyen la producción de animales transgénicos, por ejemplo, incluyendo la producción en el suero, leche y huevos. Los animales transgénicos para la producción de polipéptidos de tipo salvaje FVII son conocidos en el arte (Patente EE.UU. N ° 20020166130 y 20040133930 de publicación) y pueden ser adaptados para la producción de polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento.

210
209

Muchos vectores de expresión están disponibles y son conocidos por aquellos de habilidad en el arte de la expresión de FVII. La elección del vector de expresión está influida por la elección del sistema de acogida de expresión. Esta selección está dentro del nivel de habilidad de los artesanos calificados. En general, los vectores de expresión pueden incluir los promotores de la transcripción y, opcionalmente, potenciadores, señales de traducción, y señales de terminación de la transcripción y traducción. Los vectores de expresión que se utilizan para la transformación estable suelen tener un marcador de selección que permite la selección y el mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, un origen de replicación se puede utilizar para ampliar el número de copias de los vectores en las células. Los polipéptidos FVII o modificados también pueden ser utilizados o se expresan como la fusión 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, la fusión de una señal de secuencia, una etiqueta, como para la localización, por ejemplo, una etiqueta his_6 o una etiqueta myc, o una etiqueta para la purificación, por ejemplo, una fusión de GST, y una secuencia de la dirección de la secreción de proteínas y/o asociación de la membrana.

En una configuración, los polipéptidos FVII o modificados pueden expresarse en una forma activa, la cual la activación se logra por medio de una auto activación de la secreción siguiente de polipéptido. En otra configuración, la proteasa se expresa en una forma inactiva, zimógeno.

Los métodos de producción de los polipéptidos FVII pueden incluir coexpresión de uno o más polipéptidos heterólogos adicionales que pueden ayudar en la generación de los polipéptidos FVII. Por ejemplo, los polipéptidos pueden contribuir al post-procesamiento de la traducción de los polipéptidos FVII. Los polipéptidos ejemplares incluyen, pero no limitan a, peptidasas que ayudan a cortan secuencias de FVII precursores, tales como la secuencia propéptido, y las enzimas que participan en la modificación del polipéptido FVII, como por glicosilación, hidroxilación, carboxilación, o fosforilación. Un peptidasa ejemplar que puede ser coexpresada con FVII es PACE/furina (o PACE-SOL), que ayuda en la ruptura de la secuencia del propéptido FVII. Un ejemplo de la proteína que ayuda en la carboxilación del polipéptido FVII es la enzima sensible a la warfarina-K 2,3-reductasa de la vitamina epóxido (VKOR), que produce reducción de la vitamina K para su utilización como un cofactor por la vitamina K-dependiente-γ carboxilasa (Wajih et al., J. Biol. Chem.. 280 (36) 31,603 a 31,607). Una subunidad de esta enzima, VKORCl, puede ser coexpresada con el polipéptido FVII modificado para aumentar la γ-carboxilación de uno o varios polipéptidos adicionales que se pueden expresar desde el mismo vector de expresión como el polipéptido FVII o de un vector diferente.

a. Expresión procariota

Las procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema de producción de grandes cantidades de FVII (véase, por ejemplo, Platis et al. (2003) Protein Exp. Purif. 31 (2): 222-30, y Khalizzadeh et al. (2004) J. Ind.

212

Microbiol. Biotechnol. 31 (2): 63-69). La transformación de *E. coli* es una técnica sencilla y rápida conocida por aquellos de habilidad en el arte. Los vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles que son útiles para inducir altos niveles de expresión de la proteína y para expresar proteínas que presentan cierta toxicidad para las células huéspedes. Ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor lac, el promotor de punta, el promotor tac híbrido, la T7 y los promotores SP6 de ARN y el promotor de temperatura regulada λP_L.

El FVII puede expresarse en el medio ambiente citoplasmático de *E. coli*. El citoplasma es un entorno de reducción y de algunas moléculas, esto puede resultar en la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Los agentes reductores como el mercaptoetanol ditiotreitol y β-y desnaturalizante (por ejemplo, como guanidina-HCl y urea) pueden ser usados para resolubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de FVII en el espacio periplásmico de bacterias que proporcionan un ambiente oxidante y chaperoninas similares y disulfuro de isomerasas que conducen a la producción de la proteína soluble. Típicamente, una secuencia líder se fusiona con la proteína a ser expresa que dirige la proteína a la periplasma. El líder se retira por señales peptidasas dentro del periplasma. Ejemplos de secuencias líderes de periplásmico objetivo incluyen el líder pelB del gen Pectatoliasa y el líder de derivados del gen alcalino de fosfatasa. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la salida de la proteína expresada en el medio de cultivo. La secreción de las proteínas permite la purificación rápida y sencilla desde el

213
212
220

sobrenadante del cultivo. Las proteínas que no son secretadas pueden obtenerse en el periplasma por lisis osmótica. Similar a la expresión citoplasmática, en algunos casos pueden llegar a ser las proteínas insolubles y los desnaturalizantes y los agentes reductores se pueden utilizar para facilitar la solubilización y replegado. La temperatura de la inducción y el crecimiento también puede influir en los niveles de expresión y de solubilidad. Normalmente, se utilizan temperaturas de 250°C y 370°C. Las mutaciones también pueden ser utilizadas para aumentar la solubilidad de las proteínas expresadas. Normalmente, las bacterias producen proteínas aglicosilatadas. Así, si las proteínas requieren de glicosilación de la función, se puede añadir glicosilación *in vitro* después de la purificación de las células del huésped.

b. Levadura

Las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Yarrowia lipoiytica, Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son huéspedes de expresión útiles para FVII (véase, por ejemplo, Skoko et al. (2003) Biotechnol. Appl. Biochem. 38 (Pt3) :257-65). La levadura puede ser transformada con vectores episomales de replicación o integración cromosómica estable por recombinación homóloga. Normalmente, los promotores inducibles se utilizan para regular la expresión génica. Ejemplos de los promotores son, entre otros GAL1, GAL7, y GAL5 y promotores de metaloticneína como CUP1. Los vectores de expresión a menudo incluyen un marcador de selección, como LEU2, TRP1, HIS3, y URA3 para la selección y el mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en la levadura

214
213

son a menudo solubles y co-expresan con caperoninas, como Bip y la proteína disulfuro isomerasa, pueden mejorar los niveles de expresión y de solubilidad. Además, las proteínas expresadas en la levadura puede ser dirigidas por la secreción de la señal mediante la fusión de la secreción de péptidos como la señal de la secreción del factor de la levadura alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de superficie de células de levadura, tales como la adhesión de los receptores de apareamiento Aga2p o el *Arxula adeninivorans* glucoamilasa. Un sitio de corte de la proteasa (por ejemplo, la Kex-2 de la proteasa) puede ser diseñado para eliminar las secuencias de fundido de los polipéptidos en su salida de la vía de secreción. La levadura también es capaz de la glicosilación en motivos Asn-X-Ser/Thr.

c. **Insectos y células de insecto**

Los insectos y las células de insecto, en particular mediante un sistema de expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos FVII o modificados (véase, por ejemplo, Muneta, et al. (2003) J. Vet. Med. Sci. 65 (2) :219-23). Las células de insectos y larvas de insectos, incluyendo la expresión en la hemolinfa, expresan altos niveles de proteínas y son capaces de la mayor parte de las modificaciones post-traduccionales utilizadas por organismos superiores. Los baculovirus tienen una amplia acogida restrictiva que mejora la seguridad y reduce las preocupaciones de reglamentación de expresión eucariótica. Típicamente, los vectores de expresión para el uso de un promotor como el promotor de polihedrina de baculovirus para la expresión de alto nivel. Los sistemas comunes de baculovirus incluyen baculovirus como virus

nucleares *Autoghapha californica* de la poliedrosis californica (AcNPV), y el virus de la poliedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea de células de insecto como Sf9 derivadas de *Spodoptera frugiperda, Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpNl). Para la expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula que se expresa se funde inmediatamente aguas abajo del codón de la iniciación polihedrina del virus. Las señales de la secreción de los mamíferos están correctamente tratadas en células de insecto y se pueden utilizar para secretar la proteína expresada en el medio de cultivo. Además, las líneas celulares *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpNl) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a los sistemas de células de los mamíferos.

Un sistema de expresión alternativo en células de insecto es el uso de las células transformadas de forma estable. Las líneas celulares, como la Schnieder 2 (S2) y las células Kc (*Drosophila melanogaster*) y las células C7 (*Aedes albopictus*) se pueden utilizar para la expresión. El promotor de la metalotioneína Drosophila puede ser utilizado para inducir altos niveles de expresión en la presencia de la inducción de metales pesados con el cadmio o el cobre. Los vectores de expresión suelen ser gestionados por el uso de marcadores de selecciones, como la neomicina e higromicina.

d. Células de mamíferos

Los sistemas de expresión de mamíferos pueden ser usados para expresar polipéptidos FVII. La expresión de las construcciones pueden ser transferidas a células de mamíferos por la infección viral como el adenovirus o

215

por transferencia directa del ADN como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos, tales como la electroporación y la microinyección. Los vectores de expresión de células de mamíferos suelen incluir un sitio ARNm, una caja TATA, una secuencia de inicio de traslación (secuencia de consenso Kozak) y elementos de poliadenilación. Estos vectores incluyen a menudo el promotor de la transcripción potenciador para la expresión de alto nivel, por ejemplo, el promotor SV40-Enhancer, el promotor citomegalovirus humano (CMV), y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores son potenciadores activos en muchos tipos de células. De tejidos y células, los promotores de tipo y potenciadores de las regiones también se pueden utilizar para la expresión. Los promotores/regiones potenciadoras ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los de los genes, como la elastasa 1, la insulina, la inmunoglobulina, virus del ratón del tumor mamario, albúmina, alfa-fetoproteína, la alfa 1-antitripsina, la beta-globina, proteína básica de la mielina, la miosina la luz de la cadena-2, y la liberación de gonadotrofinas del gen de control de la hormona. Los marcadores seleccionables pueden ser utilizados para seleccionar y mantener las células con la expresión de la construcción. Ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, fosfotransferasa B higromicina, adenosina deaminasa, xantina guanina fosforibosiltransferasa, fosfotransferasa aminoglucósidos, dihidro folato reductasa y la timidina quinasa. La fusión con la superficie de las moléculas de señalización celular como TCR-ζ y FcεRI-γ

212
216

puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo en la superficie de la célula.

Muchas líneas celulares están disponibles para la expresión de mamíferos incluyendo el ratón, rata, mono, humano y el pollo y células de hámster. Las líneas de células ejemplares incluyen, pero no se limitan a, BHK (es decir, las células BHK-21), 293-F, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, líneas celulares N50 (no secretoras) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, los linfocitos, los fibroblastos, Sp2/0, COS, N1H3T3, HEK293, 293S, 293T, 2B8, y las células HKB. Las líneas celulares también están disponibles para adaptarse a medios libres de suero que facilitan la purificación de proteínas secretadas por los medios de cultivo celular. Un ejemplo es línea celular libre de suero EBNA-1 (Pham et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42).La expresión de polipéptidos recombinantes FVII que exhiben una estructura similar y modificaciones post-traduccionales como derivados del plasma FVII se conocen en el arte (véase, por ejemplo, Jurlander et al. (2003) Semin Throm Hemost). Los métodos de optimización de la vitamina K-dependiente son la expresión de proteínas conocidas. Por ejemplo, la suplementación de la vitamina K en un medio de cultivo o co-expresión de la vitamina K-dependiente γ-carboxilasas (Wajih, et al, J. Biol. Chem. 280 (36) 31603-31607) puede ayudar a las modificaciones post-traduccionales de la vitamina K-dependiente de las proteínas, tales como polipéptidos FVII.

e. **Plantas**

Las células de las plantas transgénicas y las plantas se pueden utilizar para la expresión de FVII. La expresión de las construcciones se suelen transferir a las plantas mediante la transferencia directa de ADN como el bombardeo de microproyectiles y la transferencia mediada PEG en protoplastos, y con la transformación mediada por Agrobacterium. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias de promotor y potenciador, elementos de la terminación de la transcripción, y elementos de control de la traducción. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación se dividen entre los receptores dicotiledóneas, como la Arabidopsis y el tabaco, y los anfitriones monocotiledóneas, como el maíz y el arroz. Ejemplos de los promotores de la planta utilizada para la expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de la nopalina sintasa, la ribosa bifosfato carboxilasa y el promotor de la ubiquitina y de los promotores de UBQ3. Los marcadores seleccionables como la higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa se utilizan a menudo para facilitar la selección y el mantenimiento de las células transformadas. Las células de la planta transformadas se pueden mantener en la cultura como células, agregados (tejido de callos) o regenerado en plantas enteras. Porque las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación de las células de mamíferos, esto puede influir en la elección de producir FVII en estas máquinas. Las células de las plantas transgénicas también pueden incluir las algas modificadas genéticamente para producir proteínas (véase, por ejemplo, Mayfield et al. (2003) PNAS 100:438-442). Porque las plantas tienen diferentes patrones de

219

glicosilación de las células de mamíferos, esto puede influir en la elección de producir FVII en estas máquinas.

2. Purificación

Los métodos para la purificación de polipéptidos FVII de las células del huésped dependen de las células del huésped elegido y los sistemas de expresión. Para las moléculas secretadas, las proteínas suelen ser purificadas de los medios de cultivo después de la eliminación de las células. Para la expresión intracelular, las células pueden ser lisis y las proteínas purificadas de los extractos. Cuando los organismos transgénicos, como las plantas y animales transgénicos se utilizan para la expresión, los tejidos u órganos pueden ser utilizados como material de partida para hacer un extracto de lisis celular. Además, la producción de animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en la leche o los huevos, que pueden ser recogidos, y si es necesario las proteínas pueden extraerse y purificarse mediante los métodos estándar en el arte.

El FVII puede ser purificado mediante técnicas estándar de purificación de proteínas conocidas en el arte, incluyendo pero no limitado a, SDS-PAGE, la fracción de tamaño y cromatografía de exclusión de tamaño, la precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de quelato y cromatografía de intercambio iónico. Por ejemplo, los polipéptidos FVII pueden ser purificados por cromatografía de intercambio aniónico. Un método ejemplar para purificar los polipéptidos FVII está utilizando una columna de intercambio iónico que permite la unión de los polipéptidos que tiene un dominio Gla funcional, seguida de

220
219

elución en presencia de calcio (Véase, por ejemplo, ejemplo 3). Las técnicas de purificación de afinidad también se pueden utilizar para mejorar la eficiencia y la pureza de los preparativos. Por ejemplo, los anticuerpos, los receptores y otras moléculas que se unen a FVII pueden ser utilizadas en la purificación de la afinidad. En otro ejemplo, la depuración también se puede mejorar con una columna de afinidad soluble TF (STF) (Maun et al. (2005) Prot. Sci. 14:1171-1180). Los constructos de expresión también puede ser diseñados para añadir una etiqueta de afinidad, tales como un epítopo myc, la fusión GST o His6 y purificado por afinidad con anticuerpos myc, la resina de glutatión, y Ni-resina, respectivamente, a una proteína. La pureza puede ser evaluada por cualquier método conocido en el arte como la electroforesis en gel y tinción y técnicas espectrofotométricas.

La proteasa FVII puede ser expresada y purificada para estar en una forma inactiva (formulario zimógeno) o, alternativamente, la proteasa expresada puede ser purificada en una forma activa, como por autocatálisis. Por ejemplo, los polipéptidos FVII que han sido activados a través de rotura proteolítica de Arg^{152}-Ile^{153} se pueden preparar *in vitro* (es decir, FVIIa, dos forma de cadena). Los polipéptidos FVII pueden ser primero preparados por cualquiera de los métodos de producción descritos en este documento, incluyendo pero no limitado a, la producción de células de mamíferos, seguido de la depuración. La escisión de los polipéptidos FVII en la forma activa de la proteasa, FVIIa, se puede lograr por diversos medios. Por ejemplo, autoactivation durante la incubación con vesículas de fosfolípidos en la

presencia de calcio que se puede alcanzar en 45 minutos (Nelsestuen et al. (2001) J Biol Chem 276:39825-31). Los polipéptidos FVII también se pueden activar a la terminación de la incubación con el factor Xa, el factor XIIa o de FT en la presencia de calcio, con o sin fosfolípidos (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y Broze et al. (1980) J Biol Chem 255:1242--1247, Higashi et al. (1996) J Biol Chem. 271 :26569-26574, Harvey et al. J Biol Chem 278:8363-8369).

3. Proteínas de Fusión

Las proteínas de fusión que contienen un polipéptido modificado de FVII y son de uno o más distinto polipéptidos también fueron proporcionados. Composiciones farmacéuticas que contienen tales proteínas de fusión formuladas para la administración por una vía adecuada son proporcionadas. Las proteínas de fusión son formadas al ligar en cualquier orden el polipéptido modificado de FVII y un agente, tal como un anticuerpo o un fragmento de éste, factor de crecimiento, receptor, ligando, y otro agente distinto para facilitar la purificación de un polipéptido de FVII, alterando las propiedades farmacodinámicas de un polipéptido de FVII por dirección, por ejemplo, al dirigir el polipéptido a una célula o a un tejido, y/o aumentando la expresión o la secreción del polipéptido de FVII. Cualquier proteína de fusión de FVII retiene típicamente actividad del coagulante por lo menos cerca del 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o del 95% comparada con un polipéptido de la no-fusión FVII, incluyendo el 96%, 97%, 98%, 99% o una actividad más grande del coagulante comparados con un polipéptido de no fusión.

222
221
222

El enlace de un polipéptido de FVII con otro polipéptido puede ser afectado directamente o indirectamente vía un enlazador. En un ejemplo, el enlace puede ser un enlace químico, por ejemplo vía agentes del heterobifuncional o enlaces tiol o otros enlaces similares. La fusión también puede ser efectuada por medio de un recombinante. La fusión de un polipéptido de FVII a otro polipéptido puede ser de terminal N- ó C- del polipéptido de FVII. No limitando ejemplos de los polipéptidos que pueden ser utilizados en proteínas de fusión con un polipéptido de FVII proporcionado aquí incluye, por ejemplo, un polipéptido del GST (S-transferasa del glutatión), el dominio de Fc de la inmunoglobulina G, o una secuencia de una señal heterócloga. Las proteínas de fusión pueden contener componentes adicionales, tales como la proteína de unión *E. coli* maltosa (MBP) la cual ayuda en la absorción de la proteína por las células {vea, la aplicación PCT internacional. No. WO 01/32711).

La proteína de fusión puede ser producida por técnicas estándares de recombinantes. Por ejemplo, los códigos de fragmentos de ADN de las diferentes secuencias polipeptídicas se pueden unir en-el-marco-de ligado de acuerdo con las técnicas convencionales, ejemplo, utilizando extremos romos o escalonado de Termini para la ligadura, restricción de la enzima de digestión para proporcionar el apropiados Termini, relleno de extremos cohesivos según corresponda, tratamiento de la fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables, y ligación enzimática. En otra realización, el gen de la fusión puede ser sintetizado por las técnicas convencionales, incluyendo los

222
222

sintetizadores automatizados del ADN. Alternativamente, la amplificación de PCR de los fragmentos génicos puede ser realizada usando los cebadores del anclaje que dan lugar a voladizos complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que puede ser posteriormente recocidos y reamplificados para generar una secuencia de genes quimérica (véase, ejemplo, a Ausubel *et al.* (eds.) PROTOCOLOS ACTUALES EN LA BIOLOGÍA MOLECULAR, John Wiley y Hijos, 1992). Por otra parte, muchos de los vectores de expresión están disponibles comercialmente ya que codifica una molécula de fusión {ejemplo, un polipéptido del GST). La codificación del ácido nucleico de FVII puede ser clonado en tal vector de expresión tales que la molécula de fusión esta en-el-marco-de unión de la proteína de la proteasa.

4. Modificación de polipéptido

Polipéptidos de los de FVII modificados pueden ser preparados como cadenas polipeptídicas desnudas o como un complejo. Para algunas aplicaciones, puede ser deseable preparar FVII modificado en una forma "desnuda" sin modificaciones químicas pos-traslacionales u otras modificaciones químicas. Cadenas polipeptídicas desnudas pueden ser preparadas en los huéspedes adecuados que no modifiquen pos-traslacionalmente al FVII. Estos polipéptidos también pueden prepararse en sistemas *In Vitro* y usando síntesis química del polipéptido. Para las distintas aplicaciones, modificaciones determinadas pueden ser deseadas incluyendo pegilación, albuminación, glicosilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación u otras modificaciones conocidas. Modificaciones pueden ser hechas *In Vitro* o,

224
223

por ejemplo, produciendo el FVII modificado en un huésped adecuado que produzca tales modificaciones.

5. Secuencias de nucleótidos

Las moléculas de ácido nucleico que codificaban polipéptidos de FVII o de FVII modificado son proporcionados aquí. Las moléculas de ácido nucleico incluyen variantes alélicas o variantes de empalme de cualquier polipéptido codificado de FVII. Ejemplares de las moléculas de ácido nucleico proporcionaron aquí, son cualquiera que codifique un polipéptido modificado de FVII proporcionado aquí; por ejemplo cualquier codificación que un polipéptido establecido en cualquiera de SEQ ID NOS.: 18-43, 125-150 ó 206-250. En una realización, las moléculas de ácido nucleico proporcionadas aquí tienen por lo menos 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, o 99% de la secuencia de identidad o hibridan bajo condiciones, de media o alta severidad a lo largo por lo menos del 70% de cualquier ácido nucleico completo que codifica un polipéptido de FVII proporcionado aquí. En otra realización, Una molécula de ácido nucleico puede incluir ésos con secuencias degeneradas del codón que codifican los polipéptidos de FVII proporcionados aquí.

G. Evaluando las actividades modificadas del polipéptido FVII

Las actividades y las propiedades de los polipéptidos de FVII pueden ser evaluadas *In Vitro* y/o *In Vivo*. Ensayos para tal evaluación son conocidos por los especialistas en esta técnica y el son conocido para correlacionar actividades ensayadas y resultados de las actividades terapéuticas *In Vivo*. En un ejemplo, variantes de FVII pueden ser evaluadas con respecto a FVII sin

224

modificar y/o del tipo salvaje. En otro ejemplo, la actividad de polipéptidos FVII modificados pueden ser evaluados seguidos por la exposición *In Vitro* o *In Vivo* a TFPI o a AT-III y se compara con la de los polipéptidos modificados de FVII que no han sido expuestos a TFPI o a AT-III. Los ensayos *In Vitro* incluyen cualquier ensayo del laboratorio conocido por un especialista en la técnica, como por ejemplo, los ensayos basados en la célula que incluyen ensayos de la coagulación, los ensayos de unión, los ensayos de la proteína, y los ensayos de la biología molecular. Los ensayos *In Vitro* incluyen ensayos de FVII en modelos animales así como la administración a los seres humanos. En algunos casos, la actividad *In Vivo* de FVII sea determinada evaluando sangre, suero, u otro fluido corporal para los determinantes del ensayo. Las variantes de FVII también pueden ser ensayadas *In Vivo* para evaluar una actividad o una propiedad, tal como el efecto terapéutico.

Típicamente, el ensayos descritos aquí son con respecto a la forma activa de dos cadenas de FVII, es decir. FVIIa. Tales ensayos también pueden ser realizados con la forma de cadena sencilla, por ejemplo para proporcionar un control negativo puesto que tal forma no contiene típicamente actividad proteolítica o catalítica, requeridas para la actividad coagulante de FVII. Además, tales ensayos también pueden realizarse en presencia de cofactores, tales como TF, que a veces aumenta la actividad de FVII.

1. Ensayos *In Vitro:*

Los *ensayos In Vitro* ejemplares incluyen ensayos para evaluar la modificación y la actividad del polipéptido. Las modificaciones pueden ser

226
~~225~~
~~211~~

evaluadas usando los ensayos *In Vitro* que evalúan carboxilación γ- u otras modificaciones pos-traslacionales, ensayos de la proteína y ensayos conformacionales conocidos en la técnica. Los ensayos para la actividad incluyen, pero no están limitados a, la medición de la interacción de FVII con distintos factores de coagulación, tales como TF, factor X y factor IX, ensayos proteoliticos para determinar la actividad proteolítica de los polipéptidos de FVII, ensayos para determinar la unión y/o la afinidad de los polipéptidos de FVII para las fosfatidilserinas y los distintos fosfolípidos, y de los ensayos basados en la célula para determinar el efecto de los polipéptidos de FVII en la coagulación.

Las concentraciones de los polipéptidos de FVII modificados pueden ser evaluadas por los métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitados a, los ensayos de inmunoanálisis de la cuasi-enzima (ELISA), SDS-PAGE; Bradford, Lowry, métodos de BCA; Absorbancia UV, y otros métodos de etiquetado de la proteína cuantificable, por ejemplo, pero no limitado a, métodos inmunológicos, radiactivos y fluorescentes y métodos relacionados.

La evaluación de productos de escisión de las reacciones de la proteólisis, incluyendo la escisión de los polipéptidos de FVII o de los productos producidos por actividad de la proteasa de FVII, pueden ser realizados usando los métodos que incluyen, pero no están limitados a, la división del substrato cromogénico, HPLC, análisis de SDS-PAGE, ELISA, secado occidental, inmunohistoquímica, la inmunoprecipitación, la secuenciación de NH2-terminal, y el etiquetado de la proteína.

227
~~226~~

Las propiedades estructurales de los polipéptidos de FVII modificado también pueden ser evaluadas. Por ejemplo, la cristalografía de la radiografía, la resonancia magnética nuclear (NMR), y la microscopía del crioelectrón (crio-EM) de los polipéptidos de FVII modificado pueden ser realizados para evaluar la estructura tridimensional de los polipéptidos de FVII y/o de las distintas propiedades de los polipéptidos de FVII, tales como CA^{2+} o la unión del cofactor.

Además, la presencia y la extensión de la degradación de FVII pueden ser medidas por técnicas estándares tales como la electroforesis en gel de poliacrilamida del dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), y el secado occidental de electroforesis de las muestras que contenían FVII. Los polipéptidos de FVII que se han expuesto a las proteasas también pueden ser sometidos a la secuenciación de la N-terminal para determinar la posición o cambios en los sitios de escisión de los polipéptidos modificados de FVII.

a. **Modificación pos-traslacional**

Los polipéptidos de FVII también pueden ser evaluados para la presencia de modificaciones pos-traslacionales. Tales son los ensayos conocidos en la técnica e incluyen ensayos para medir el glicosilación, la hidroxilación, y la carboxilación. En un ensayo ejemplar para el glicosilación, el análisis del carbohidrato puede ser realizado, por ejemplo, con el análisis SDS de las páginas de los polipéptidos de FVII expuestos a la hidrazinólisis o al tratamiento de la endoglicosidasa.

La hidrazinólisis libera glicanos vinculados N y O de glicoproteínas mediante la incubación con anhidro hirazina, mientras que la liberación de endoglicosidasa involucra PNGasa F, la cual libera la mayoría de glicanos N de las glicoproteínas. La hidranólisis o tratamiento de endoglicosidasa de polipéptidos FVII genera un terminal de reducción que puede ser etiquetado con una etiqueta de fluoróforo o cromóforo. Los polipéptidos FVII etiquetados pueden ser analizados mediante electroforesis de carbohidrato asistido de fluoróforo (FACE). La etiqueta fluorescente para glicanos también puede ser utilizada para el análisis, perfilamiento o huella de monosacáridos de patrones de glicosilación compleja mediante HPLC. Los métodos HPLC ejemplares cinlueyn cromatografía de interacción hidrofílica, interacción electrónica, intercambio de iones, interacción hidrofóbica, y cromatografía de exclusión de tamaño. Las sondas de glicano ejemplares incluyen, pero no se limitan a, 3-(acetilamino)-6-aminoacridina (AA-Ac) y 2-ácido aminobenzoico (2-AA). Las mitados de carbohidrato también pueden ser detectadas a través del uso de anticuerpos específicos que reconocen el polipéptido FVII glicosilado. Un ensayo ejemplar para medir la hidroxilación β comprende el análisis de HPLC de fase reversa de polipéptidos FVII que han sido sujetos a hidrólisis alcalina (Przysiecki *et al.* (1987) PNAS 84:7856-7860). La carboxilación y carboxilación γ de polipéptidos FVII puede ser evaluada usando espectrometría de masa con análisis de tiempo de vuelo de ionización de deserción de láser asistida por matriz (MALDI-TOF), como se describe en el arte (ver por ejemplo, Harvey *et al.* J Biol Chem 278:8363-8369, Maum *et al.* Prot Sci 14:1171-1180). La

interacción de un polipéptido FVII que contiene el propéptido (pro-FVII) con la carboxilasa responsable por la modificación pos-translacional de carboxilato y también puede ser evaluada. La constante de disociación (K_d) seguida a la incubación de carboxilasa con polipéptidos pro-FVII etiquetados con fluorescina puede ser medida mediante la determinación de la cantidad de carboxilasa unida por anisotropía (Lin *et al.* (2004) J Biol Chem 279:6560-6566).

b. **Actividad proteolítica**

Los polipéptidos FVII modificados pueden ser probados para actividad proteolítica. La actividad proteolítica del FVII puede ser medida usando sustratos cromogénicos tales como Cromozim t-Pa ($MeSO_2$-D-Phe-Gly-Arg-pNA), S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA), S-2266 (H-D-Val-Leu-Arg-pNA), S-2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), Espectrozima FXa y Espectrozima FVIIa (CH3SO2-D-CHA-But-Arg-pNA). Los polipéptidos FVII, solos o en presencia de TF, son incubados con concentraciones variantes de sustrato cromogénico. La ruptura del sustrato puede ser monitoreada mediante la absorbencia y la tasa de hidrólisis de sustrato determinada por regresión lineal usando un programa de computador fácilmente disponible.

La activación de sustratos de factor de coagulación, tales como FX, por polipéptidos FVII también puede ser evaluada. Los polipéptidos FVII, con o sin preincubación con TF, pueden ser incubados con FX purificado (disponible comercialmente). La cantidad de FXa activo producido como consecuencia de la incubación con polipéptidos FVII es medida como actividad de FXa para un sustrato cromogénico, tal como S-2222 o FXa Spectrafluor (CH3SO2-D-CHA-

230
229

Gly-Arg.AMC.AcOH), el cual es monitoreado por medio de los cambios de absorbencia (Harvey *et al.* J Biol Chem 278:8363-8369, ver también el Ejemplo 5 más adelante). Una fuente de fosfolípidos también puede se incluida en la incubación de FVII y FX (Nelsestuen *et al.* (2001) J Biol Chem 276:39825-31).

c. **Actividad de coagulación**

Los polipéptidos FVII pueden ser probados para actividad de coagulación mediante el uso de ensayos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, algunos de los ensayos incluyen, pero no se limitan a, un ensayo de coagulación de dos etapas (Leibman *et al.* (1985) PNAS 82:3879-3883); el ensayo de tiempo de protrombina (PT, el cual puede medir la actividad dependiente de TF del FVIIa); tiempo de coagulacióin activado (ACT); tiempo de coagulación activada recalcificada; el tiempo de coagulación de Lee-White; o tromboelastografía (TEG) (Pusateri *et al.* (2005) Critical Care 9:S15-S24). Por ejemplo, la actividad de coagulación de un polipéptido FVII modificado puéde ser determinada por un ensayo a base de PT en donde el FVII es diluido en plasma deficiente de FVII, y mezclado con reactivo de tiempo de protrombina (recombinante TF con fosfolípidos y calcio), tal como el disponible como Innovin™ de Dade Behring. La formación del coágulo es detectada ópticamente y el tiempo de coagulación es determinado y comparado contra el plasma deficiente de FVII solo.

d. **Unión y/o inhibición por otras proteínas**

Los ensayos de inhibición pueden ser utilizados para medir la resistencia de los polipéptidos FVII modificados a inhibidores de FVII, tal como, por

ejemplo, TFPI y AT-III, o moléculas tales como Zn^{2+}. Las evaluaciones de inhibición de otros inhibidores también pueden ser probadas e incluyen, pero no se limitan a, otros inhibidores de serina proteasa, y anticuerpos específicos de FVII. La inhibición puede ser evaluada mediante la incubación de, por ejemplo, TFPI, AT-III o Zn^{2+} con polipéptidos FVII que han sido preincubados con TF. La actividad del FVII puede luego ser medida utilizando una o más ensayos de actividad de coagulación descritos anteriormente, y la inhibición por TFPI, AT-III o Zn^{2+} puede ser evaluada mediante la comparación de la actividad de los polipéptidos FVII incubados con el inhibidor, con la actividad de polipéptidos FVII que no fueron incubados con el inhibidor.

Los polipéptidos FVII pueden ser probados para la unión a otros factores de coagulación e inhibidores. Por ejemplo, las interacciones directas o indirectas de FVII con cofactores, tales como TF, sustratos, tales como FX y FIX, e inhibidores, tales como TFPI, antitrombina III y heparina pueden ser evaluados usando cualquier ensayo de unión conocido en el arte, que incluye, pero no se limita a, inmunoprecipitación, purificación de columna, SDS-PAGE no reductor, ensayos de BIAcore®, resonancia de plasma de superficie (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 fragmento de proteína (PCA), espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR), dispersión ligera, equilibrio de sedimentación, cromatografía de filtración de gel de zona pequeña, retardación de gel, secante de lejano oeste, polarización de

fluorescencia, huella de proteína de radical hidroxilo, visualización de fago, y varios sistemas de híbridos dobles. En un ejemplo la unión de Zn^{2+} es evaluada usando análisis de equilibrio (Petersen *et al.*, (2000) Protein Science 9:859-866).

e. **Afinidad de fosfolípidos**

La unión y/o afinidad del polipéptido FVII modificado por fosfotidilserina (PS) y otros fosfolípidos puede ser determinada usando ensayos bien conocidos en el arte. Los fosfolípidos altamente puros (por ejemplo, concentraciones conocidas de PS bovina y fosfatidilcolina (PC) de huevo, las cuales se encuentran disponibles comercialmente, tales como de Sigma, en solvente orgánico que puede ser utilizado para preparar vesículas de fosfolípidos unilaminar pequeñas. La unión del polipéptido FVII a estas vesículas PS/PC puede ser determinada por la dispersión de luz relativa a 90° de la luz incidente. La intensidad de la dispersión de luz con PC/PS solo y con PC/PS7FVII es medida para determinar la disociación constante (Harvey *at al.* J Biol Chem 278:8363-8369). La resonancia de plasma de superficie, tal como en un instrumento biosensor BIAcore, también puede ser utilizado para medir la afinidad de polipéptidos FVII para las membranas de fosfolípidos (Sun *et al.* Blood 101:2277-2284).

2. **Modelos animales no humanos**

Los modelos de animales no humanos pueden ser utilizados para evaluar la actividad, eficacia y seguridad de polipéptidos FVII modificados. Por ejemplo, los animales no humanos pueden ser utilizados como modelos para

233
232

una enfermedad o condición. Los animales no humanos pueden ser inyectados con enfermedad y/o sustancias que inducen fenotipo antes de la administración de variantes de FVII, tal como cualquier variante de FVII establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 18-43, 125-150 o 206-250, para monitorear los efectos en la progresión de enfermedad. Los modelos genéticos también son útiles. Los animales, tales como ratones, pueden ser generados los cuales imitan una enfermedad o condición por la sobre-expresión, bajo expresión o eliminación de uno o más genes, tales como, por ejemplo, ratones de eliminación de factor VIII que muestran hemofilia A (Bi *et al.* (1995) Nat Gen 10:19-121). Dichos animales pueden ser generados por medio de técnicas transgénicas de producción de animal bien conocidas en el arte o usando cadenas de mutante inducidas u que ocurren de forma natural. Los ejemplos de modelos de animales no humanes útiles de enfermedad asociada con FVII incluyen, pero no se limitan a, modelos de desórdenes de sangrado, en particular hemofilia, o enfermedad trombótica. Los modelos de animales no humanos para lesión también pueden ser utilizados para evaluar una actividad, tal como la actividad de coagulación, de polipéptidos FVII. Estos modelos de animales no humanos pueden ser utilizados para monitorear la actividad de las variantes de FVII en comparación con un polipéptido FVII tipo salvaje.

Los modelos de animales también pueden ser utilizados para monitorear la estabilidad, vida media, y aclaración de los polipéptidos FVII modificados. Dichos ensayos son útiles para comparar los polipéptidos FVII modificados y para calcular dosis y regimenes de dosis para las pruebas adicionales de

234

233

animales no humanos y de humanos. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado, tal como cualquier variante de FVII suministrado acá incluyendo, por ejemplo, cualquiera establecido en cualquiera de las SEQ ID NOS: 18-43, 125-150 o 206-250, puede ser inyectado en la vena de la cola de los ratos. Las muestras de sangre son luego tomadas en puntos de tiempo después de la inyección (tales como minutos, horas y días después) y luego el nivel de los polipéptidos FVII modificados en las muestras corporales incluye, pero no se limita a, suero o plasma pueden ser monitoreados en puntos de tiempo específicos por ejemplo por ELISA o radioinmunoensayo. Las muestras de sangre de varios puntos de tiempo seguidos a la inyección de los polipéptidos FVII también pueden ser probadas para la actividad de coagulación utilizando varios métodos, tal como se describe en los Ejemplos 9 y 14. Estos tipos de estudios farmacocinéticas pueden suministrar información con relación a la vida media, aclaramiento y estabilidad de los polipéptidos FVII, los cuales pueden asistir en la determinación de dosis adecuadas para la administración como un procoagulante.

Los polipéptidos FVII modificados, tales como cualquiera de los establecidos en cualquiera de las SEQ ID NOS:18-43, 125-150 o 206-250, pueden ser probados para efectividad terapéutica usando modelos de animales para hemofilia. En un ejemplo no limitante, un modelo animal tal como un ratón puede ser utilizado. Los modelos ratones de hemofilia están disponibles en el arte y pueden ser empleados para probar los polipéptidos FVII modificados. Por ejemplo, un modelo ratón de hemofilia A que es producida por inyección con

anticuerpos anti-FVIII pueden ser utilizados para evaluar la actividad coagulante de los polipéptidos FVII (ver por ejemplo, Ejemplos 8 y 14, y Tranholm *et al.* Sangre (2003) 102:3615-3620). Un modelo de ratón de hemofilia B también puede ser utilizado para probar los polipéptidos FVII (Margaritis *et al.* (2004) J Clin Invest 113:1025-1031). Los modelos no ratón de desórdenes de sangrado también existen. La actividad de polipéptido FVII puede ser evaluada en ratas con sangrado inducido de warfarina o sanragdo inducido de melagatran (Diness *et al.* (1992) Throm Res 67:233-241, Elg *et al.* (2001) Thromb Res 101:145-157), y conejos con sangrado inducido de heparina (Chan *et al.* (2003) J Thromb Haemost 1:760:765). Los perros con hemofilia A, hemofilia B y enfermedad de von Willebrand consanguíneas que muestran sangrado severo también pueden ser utilizados en estudios animales no humanos con polipéptidos FVII (Brinkhous *et al.* (1989) PNAS 86:1382-1386). La actividad de los polipéptidos FVII también puede ser evaluada en un modelo de ratón de sangrado en el cual se induce trombocitopenia mediante una combinación de radiación gama y el uso de anticuerpos de plaquetas (Tranholm *et al.* (2003) Thromb Res 109:217-223).

Adicional a los animales con desórdenes de sangrado generalizados, lesión y modelos de trauma pueden ser utilizados para evaluar la actividad de los polipéptidos FVII, y su seguridad y eficacia como un coagulante terapéutico. Los ejemplos no limitantes de dichos modelos incluyen modelo de estenosis coronaria en conejo (Fatorutto *et al.* (2004) Can J Anaesth 51:672-679), un modelo de lesión de hígado grado V en cerdos (Lynn *et al.* (2002) J Trauma

236
285
251

52:703-707), un modelo de lesión de hígado grado V en cerdos (Martinowitz *et al.* (2001) J Trauma 50:721-729) y modelo de aortotomía en cerdo (Sondeem *et al.* (2004) Shock 22:163-168).

3. Ensayos Clínicos

Varios ensayos están disponibles para evaluar la actividad del FVII para uso clínico. Dichos ensayos pueden incluir la evaluación de la coagulación, estabilidad de proteína y vida media *in vivo*, y ensayos fenotípicos. Los ensayos fenotípicos y los ensayos para evaluar el efecto terapéutico del tratamiento de FVII incluyen evaluaciones de los niveles de la sangre de FVII (por ejemplo, medición del FVII de suero antes de la administración y los puntos de tiempo seguidos a las administraciones incluyendo, después de la primera administración, inmediatamente después de la última administración, y puntos de tiempo entre estos, que corrigen para el índice de masa corporal (BMI)), evaluación de la coagulación sanguínea *in vivo* usando los métodos descritos anteriormente seguido al tratamiento con FVII (por ejemplo, ensayo PT), y respuesta fenotípica al tratamiento de FVII que incluye la mejora de los síntomas sobre el tiempo en comparación con los sujetos tratados con un FVII no modificado y/o tipo salvaje o placebo. Los pacientes tratados con polipéptidos FVII pueden ser monitoreados para pérdida de sangre, requerimiento de transfusión, y hemoglobina. Los pacientes pueden ser monitoreados regularmente por un periodo de tiempo para administraciones de rutina o repetidas, o seguido a la administración en respuesta a eventos agudos, tales como hemorragia, trauma, o procedimientos quirúrgicos.

237
236

H. Formulación y Administración

Las composiciones para el uso en el tratamiento de desórdenes de sangrado se suministran acá. Dichas composiciones contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido factor VII como se describe acá. Las concentraciones efectivas de polipéptidos FVII o derivados farmacéuticamente aceptados de los mismos son mezcladas con un portador o vehículo farmacéutico adecuado para la administración sistémica, tópica o local. Los compuestos son incluidos en una cantidad efectiva para el tratamiento del desorden seleccionado. La concentración de compuesto activo en la composición dependerá de la absorción, inactivación, tasas de excreción del compuesto activo, cronograma de dosis, y cantidad administrada así como otros factores conocidos para aquellos expertos en la materia.

Los portadores o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos acá suministrados incluyen cualquier portador conocido para los expertos en la materia para ser adecuado para el modo particular de administración. Las composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido FVII descrito acá también pueden ser suministradas como un polvo liofilizado que es reconstituido, tal como con agua estéril, inmediatamente antes de la administración.

1. Formulaciones

Las composiciones farmacéuticas que contienen FVII pueden formularse en cualquier forma convencional por la mezcla de una cantidad selecta de

230
237

polipéptido con uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. La selección de la portador o excipiente está dentro de la habilidad de la profesión de la administración y puede depender de una serie de parámetros. Estos incluyen, por ejemplo, el modo de administración (es decir, sistémica, oral, nasal, pulmonar, locales, tópicos, o de cualquier otro modo) y el trastorno tratado. Las composiciones farmacéuticas aquí contenidas puede ser formuladas para la dosis única (directo), la administración o para la dilución o la modificación de otros. Las concentraciones de los compuestos en las formulaciones son eficaces para la entrega de una cantidad, de la administración, que es eficaz para el tratamiento previsto. Normalmente, las composiciones están formuladas para la administración de dosis única. Para formular una composición, la fracción del peso de un compuesto o mezcla de este producto se disuelve, suspendida, dispersa o mezclada en un vehículo seleccionado en una concentración efectiva de tal manera que la condición del tratado sea aliviada o mejorada.

Los polipéptidos modificados FVII del presente documento pueden ser formulados para la administración a un sujeto como una proteína de dos cadenas FVIIa. Los polipéptidos modificados FVII pueden ser activados por cualquier método conocido en el estado de la técnica a la formulación. Por ejemplo, el FVII puede ir bajo activación durante la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico (Jurlander et al. (2001) Semin Thromb Hemost 27:373-384). Los polipéptidos modificados FVII también pueden ser activados mediante la incubación con FXa inmovilizados en cuentas (Kemball-

239

Cook et al. (1998) J Biol Chem 273:8516-8521), o cualquier otro método conocido en el arte (véase también el ejemplo 3). La inclusión de calcio en estos procesos, asegura la plena activación y correcto plegamiento de la proteína FVIIa modificada. Los polipéptidos modificados FVII del presente documento también pueden ser formulados para la administración como una proteína de cadena única. Los polipéptidos de cadena única FVII pueden ser purificados de forma que se evite su degradación (véase, por ejemplo, US6677440). Los polipéptidos modificados FVII del presente documento pueden ser formulados de tal manera que las formas de cadena única y dos cadenas se encuentran en la composición farmacéutica, en cualquier proporción por la selección adecuada del medio para eliminar o controlar la auto activación.

El compuesto puede ser suspendido en forma micronizada u otra forma adecuada, o puede ser derivatizada para producir un producto activo más soluble. La forma de la mezcla resultante depende de una serie de factores, incluyendo el modo previsto de la administración y la solubilidad del compuesto en el portador o vehículo elegido. Las mezclas resultantes son soluciones, suspensiones, emulsiones y otros mezclas, y pueden ser formuladas como una mezcla no acuosa o acuosa, cremas, geles, cremas, emulsiones, soluciones, jarabes, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, aerosoles, supositorios, vendajes, o cualquier otra fórmula adecuada para administración sistémica, tópica o local. Para la administración interna local, como por ejemplo, intramuscular, parenteral o la administración

240
289

intra-articular, los polipéptidos pueden ser formulados como una suspensión acuosa de solución en un medio básico, como la solución salina isotónica o se combinan con un apoyo biocompatible o bioadhesivo destinado a la administración interna. La concentración efectiva es suficiente para mejorar la condición específica y puede ser determinada empíricamente. Para formular una composición, la fracción del peso del compuesto que se disuelva, suspendido, dispersos o mezclados en un vehículo seleccionado en una concentración efectiva de tal manera que la condición objetiva sea aliviada o mejorada.

En general, las composiciones farmacéuticamente aceptables son preparados a la vista de la aprobación de un organismo regulador o de otro preparado de conformidad con la farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y en seres humanos. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores tales como diluyentes, coadyuvantes, excipientes o vehiculos con los que se administran una isoforma. Estos portadores farmacéuticos de líquidos pueden ser estériles, como el agua y aceites, incluyendo los de petróleo, animales, vegetales o de origen sintético, como el aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es un portador típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Soluciones salinas y dextrosa y soluciones acuosas de glicerol también se pueden emplear como portadores de líquidos, especialmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener un ingrediente activo: un diluyente como la lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, o

241
240

carboximetilcelulosa, un lubricante, como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco, y un aglutinante, como el almidón, gomas naturales, tales como goma de mascar acaciagelatin, glucosa, melaza, polinilporrolidina, celulosas y sus derivados, povidona, crospovidones y otros aglutinantes tales como los que se conocen en el arte. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, diatomita, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerina, propileno glicol, agua y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener pequeñas cantidades de mojar o agentes emulsionantes, o agentes amortiguadores de pH, por ejemplo, el acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, sorbitol, acetato de sodio trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros agentes. Estas composiciones pueden adoptar la forma de las soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, y las formulaciones de liberación sostenida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, la gelatina para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse con una mezcla de polvo de un compuesto terapéutico y una base de polvo adecuado, tal como la lactosa o almidón. Una composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como los triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar, como los grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, y otros dichos agentes. Los preparativos para la administración oral, también pueden ser

242
241

adecuadamente formulados con inhibidores de la proteasa, como un inhibidor de Bowman-Birk, un inhibidor de Bowman-Birk conjugado, la aprotinina y camostat. Ejemplos de los portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por EW Martin. Estas composiciones contienen una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, generalmente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada del portador para proporcionar una forma adecuada de administración a un sujeto o paciente.

La formulación debe adaptarse a la modalidad de administración. Por ejemplo, el FVII modificado puede ser formulado para la administración parenteral por inyección (por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua). Las composiciones inyectables pueden adoptar diversas formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril o una suspensión en un tóxico por vía parenteral aceptable de diluyente o disolvente, por ejemplo, como una solución de 1-4, butanodiol. Los aceites fijos estériles son convencionalmente empleados como disolventes o medio de suspensión. Para este fin, cualquier aceite fijo suave puede ser empleado, incluyendo pero no limitado a, mono-sintéticos o diglicéridos, ácidos grasos (incluyendo el ácido oleico), aceites vegetales naturales como el aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, y otros aceites sintéticos o los vehículos grasos como oleato de etilo. Los intermediarios, conservantes, antioxidantes, y los ingredientes adecuados, se

243
242

pueden incorporar como se necesite o alternativamente, pueda comprender la formulación.

Los polipéptidos pueden ser formulados como los ingredientes activos farmacéuticos únicos en la composición o se pueden combinar con otros ingredientes activos. Los polipéptidos pueden ser objeto de entrega, tales como la conjugación de un agente de selección, como un anticuerpo. Las suspensiones liposomal, incluidos los tejidos de orientación liposomas, también puede ser adecuados como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden ser preparados de acuerdo a los métodos conocidos por los expertos en el arte. Por ejemplo, las formulaciones de liposomas pueden ser preparadas como se describe en la Patente de EE.UU. nº 4.522.811. La entrega liposomal también puede incluir formulaciones de liberación lenta, como las matrices de productos farmacéuticos, tales como geles de colágeno y liposomas modificados con fibronectin (véase, por ejemplo, Weiner et al. (1985) J Pharm Sci. 74 (9): 922-5). Las composiciones aquí contenidas pueden contener uno o más adyuvantes que faciliten la entrega, tales como, pero no están limitados a, los portadores inertes, o sistemas de dispersión coloidal. Los ejemplos representantes y no limitativos de portadores inertes, pueden ser seleccionados de agua, alcohol isopropílico, fluoruros de carbono gaseoso, alcohol etílico, glicol de pirrolidona de vinilo, propileno, gel de producción de material, alcohol estearíiico, ácido esteárico, esperma de ballena, sorbitán, metil celulosa , así como combinaciones adecuadas de dos o más de los mismos. El compuesto activo es incluido en el portador farmacéuticamente aceptable en una cantidad

suficiente para ejercer un efecto terapéutico útil en la ausencia de efectos secundarios no deseados sobre el tema tratado. La concentración terapéuticamente efectiva puede ser determinada empíricamente mediante pruebas de los compuestos conocidos in vitro e in vivo en los sistemas, como los ensayos previstos aquí.

a. Dosis

La cantidad exacta o de dosis del agente terapéutico administrado depende del polipéptido FVII particular, la vía de administración, y otras consideraciones, tales como la gravedad de la enfermedad y el peso y el estado general de la materia. La administración local del agente terapéutico normalmente requieren una dosis más pequeña que cualquier modo de administración sistémica, aunque la concentración local del agente terapéutico puede, en algunos casos, ser mayor después de la administración local que se puede lograr con la seguridad en la administración sistémica. Si es necesario, una determinada dosis y la duración y el protocolo de tratamiento puede ser determinados empíricamente o de forma extrapolada. Por ejemplo, las dosis ejemplares de polipéptidos recombinantes y nativas FVII pueden ser utilizados como puntos de partida para determinar las dosis apropiadas. Por ejemplo, un polipéptido FVII recombinante (rFVIIa) que se ha activado para rFVIIa, NovoSeven®, ha sido administrado a pacientes con hemofilia A o hemofilia B, que están experimentando un episodio hemorrágico, con una dosis de 90 µg/kg por infusión de bolo de 2 a 5 minutos, logrando un nivel de efectividad en la circulación de al menos 2 µg/ml. La dosis se repite cada 2 horas hasta que se

logre la hemostasia. Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser eficaces en cantidades de dosis reducida y/o frecuencias comparadas con dicha FVII recombinante. Por ejemplo, en los polipéptidos FVII modificados aquí contenidos pueden ser administrados en una dosis 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 realizaciones, la dosis puede ser mayor, como 100 µg/kg, 110 µg/kg, 120 µg/kg, o superior. La duración del tratamiento y el intervalo entre inyecciones variarán según la gravedad de la hemorragia y la respuesta del paciente al tratamiento, y pueden ajustarse en consecuencia a esto. Los factores tales como el nivel de actividad y la vida media del FVII modificado en comparación con el FVII sin modificar puede tenerse en cuenta al tomar decisiones en la dosis. Las dosis y regímenes particulares pueden ser determinados empíricamente.

En otro ejemplo, un polipéptido FVII recombinante (rFVIIa) que se ha activado para rFVIIa, NovoSeven®, ha sido administrado a pacientes con deficiencia congénita FVII que están experimentando un episodio hemorrágico, con una dosis de 15-30 µg/kg en infusión de bolo de 2 a 5 minutos. La dosis se repite cada 4-6 horas hasta conseguir la hemostasia. Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser eficaces en cantidades de dosis reducida y/o frecuencias en comparación con dicho FVII recombinante. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificado aquí contenido puede ser administrado en una dosis de 20 µg/kg, 15 µg/kg, 10 µg/kg, 5 µg/kg, 3 µg/kg o menos. En algunos ejemplos, la dosis puede ser mayor, por ejemplo, 35 µg/kg,

40 µg/kg, 45 µg/kg, o superior. La duración del tratamiento y el intervalo entre inyecciones variará con la gravedad de la hemorragia y la respuesta del paciente al tratamiento, y pueden ajustarse en consecuencia. Los factores como el nivel de actividad y la vida media del FVII modificado en comparación con el FVII sin modificar puede ser utilizado para tomar decisiones en la dosis. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado que presenta una vida media más larga que un polipéptido FVII sin modificar puede administrarse en dosis menores y/o con menor frecuencia que el polipéptido FVII sin modificar. Del mismo modo, las dosis requeridas para el efecto terapéutico utilizando un polipéptido FVII modificado que muestra una mayor actividad coagulante en comparación con un polipéptido FVII sin modificar puede reducirse en frecuencia y cantidad. Las dosis y regímenes particulares pueden ser empíricamente determinados por una persona de habilidad en el arte.

b. Formas de dosificación

Compuestos farmacéuticos terapéuticamente activos y sus derivados se suelen formular y administrar en las formas de dosificación de unidad o formas de dosificación múltiple. Las formulaciones pueden ser asignadas a la administración a los seres humanos y animales en las formas farmacéuticas que incluyen, pero no están limitados a, tabletas, cápsulas, pastillas, polvos, granulados, soluciones parenterales estériles o suspensiones, soluciones orales o suspensiones, y emulsiones de petróleo en aguas que contengan cantidades adecuadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo. Cada dosis contiene una cantidad predeterminada de

247

246

262

compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador farmacéutico requerido, vehículo o diluyente. Ejemplos de las formas de dosis unitarias incluyen ampollas y jeringas y empaquetados individuales, tabletas o cápsulas. En algunos ejemplos, la unidad de dosis es un polvo liofilizado que se reconstituye antes de su administración. Por ejemplo, un polipéptido FVII puede proporcionarse en forma de polvo liofilizado que se reconstituye con una solución adecuada para generar una solución de una sola dosis de inyección. En algunas configuraciones, el polvo liofilizado puede contener el polipéptido FVII y componentes adicionales, tales como sales, de tal manera que los resultados de la reconstitución con agua destilada estéril es un polipéptido FVII en una solución tampón o solución salina. La unidad de formas de dosificación puede ser administrada en fracciones o múltiplos de la misma. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación idéntica de unidad envasada en un único contenedor que se administra en forma de dosis unitaria segregada. Ejemplos de las formas de dosis múltiples incluyen viales, frascos de tabletas o cápsulas o botellas de litros o galones. Por lo tanto, la forma de dosis múltiple es un múltiplo de la unidad de dosis que no es segregado en el empacamiento.

2. Administración de polipéptidos FVII modificados

Los polipéptidos FVII del presente documento (es decir, compuestos activos) pueden ser administrados in vitro, ex vivo o in vivo por el contacto con una mezcla, como un fluido corporal o de otra muestra 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 puede ponerse en contacto con los polipéptidos FVII que están recubiertos por un tubo o filtro, como por ejemplo, un tubo o filtro en un sistema de circulación. Cuando se administra in vivo, los compuestos activos pueden ser administrados por cualquier vía apropiada, por ejemplo, vía oral, nasal, pulmonar, parenteral, por vía intravenosa, por vía intradérmica, subcutánea, intraarticular, intracisternal, intraocular, intraventricular, intratecal, vía intramuscular, intraperitoneal, intratraquealmente o tópica , así como por cualquier combinación de dos o más de los mismos, en estado líquido, semi-líquido o sólido, y están formulados de una manera adecuada para cada vía de administración. Los polipéptidos FVII modificados se pueden administrar una o más de una vez, como dos, tres veces, cuatro veces, o cualquier número de veces que se requieren para lograr un efecto terapéutico. Las administraciones múltiples pueden ser efectuadas por cualquier vía o la combinación de rutas, y puede ser administrada por hora, cada 2 horas, cada tres horas, cada cuatro horas o más.

La ruta más adecuada para la administración variará dependiendo del estado de la enfermedad a tratar, por ejemplo, la localización de la hemorragia. Generalmente, los polipéptidos FVII serán administrado por inyección intravenosa en bolo, con una administración (infusión) de tiempo de aproximadamente de 2-5 minutos. En otros casos, los niveles en sangre deseables de FVII pueden ser gestionados por una infusión continua de los agentes activos, determinados por los niveles de plasma. Cabe señalar que el

247
248

médico sabe cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar el tratamiento a dosis más bajas debido a la toxicidad, o de la médula ósea, el hígado o disfunciones renales. Por el contrario, el médico también sabe cómo y cuándo ajustar el tratamiento a los niveles más altos si la respuesta clínica no es adecuada (que excluyen los efectos secundarios tóxicos). En otros casos, la localización de la hemorragia podría indicar que la formulación de FVII se administra a través de rutas alternativas. Por ejemplo, la administración local, incluyendo la administración en el cerebro (por ejemplo, por vía intraventricular) podría llevarse a cabo cuando el paciente experimenta sangrado en esta región. Del mismo modo, para el tratamiento de hemorragias en las articulaciones, la administración local por inyección del agente terapéutico en la articulación (es decir, intraarticular, intravenosa o subcutánea media) pueden ser empleados. En otros casos, la administración tópica del agente terapéutico para la piel, por ejemplo, formulada en forma de crema, gel o pomada, o la administración a los pulmones por inhalación o intratraquealmente, puede ser apropiada cuando el sangrado se localiza en estas áreas.

Los casos en que los polipéptidos FVII modificados son formulados como una preparación de depósito, las formulaciones de tardía acción pueden ser administradas por la implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos terapéuticos se pueden formular con adecuados materiales poliméricos o hidrofóbicos (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o

250
249

resinas de intercambio iónico, o como derivados, poco solubles, por ejemplo, como una sal muy poco 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 de la unidad que contiene el ingrediente activo. El paquete, por ejemplo, contiene hojas de metal o plástico, como un blister. El envase o el dispositivo de distribución puede ir acompañado de instrucciones para su administración. Las composiciones que contengan los agentes activos pueden ser empaquetadas como los artículos de fabricación que contienen material de embalaje, un agente siempre presente, y una etiqueta que indica el trastorno para el que se presta el agente.

3. **La administración de ácido nucleico que codifica los polipéptidos FVII modificados (terapia génica)**

También se proporcionan composiciones de moléculas de ácido nucleico que codifica los polipéptidos FVII modificados y vectores de expresión de codificación y que sean adecuados para la terapia génica. En lugar de entregar las proteínas, los ácidos nucleicos puede ser administrados en vivo, como sistémica o por otra vía, o ex vivo, como por la eliminación de las células, incluyendo los linfocitos, la introducción de la nucleicos en el mismo, y reintroducción en el receptor o un recipiente compatible.

Los polipéptidos FVII modificados pueden ser entregados a las células y los tejidos por la expresión de moléculas de ácido nucleico. Los polipéptidos FVII modificados se pueden administrar como moléculas de ácido nucleico que

257

250
206

codifican los polipéptidos FVII modificados, incluidas las técnicas ex vivo y directo en la expresión in vivo. Los ácidos nucleicos pueden ser entregados a las células y los tejidos por cualquier método conocido para aquellos de habilidad en el arte. Las secuencias de ácido nucleico aisladas pueden ser incorporadas en vectores para su manipulación posterior. Como se usa aquí, el vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se utilizan para introducir ADN heterólogo en células, ya sea para la expresión o la replicación de la misma. La selección y uso de estos vehículos se encuentra dentro de la habilidad del artesano.

Los métodos para la administración de polipéptidos FVII modificados por la expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican, incluyen la administración de vectores recombinantes. El vector puede ser diseñado para permanecer episomal, como por la inclusión de un origen de replicación, o pueden ser diseñado para integrarse en un cromosoma en la célula. Los polipéptidos FVII modificados también pueden ser utilizados en la terapia génica ex vivo de expresión utilizando vectores no virales. Por ejemplo, las células pueden ser modificadas para expresar un polipéptido FVII modificado, tal como la integración de una codificación de polipéptidos FVII modificados de ácido nucleico en una ubicación de genómica, ya sea operativamente ligada a secuencias reguladoras o de tal manera que se coloca quirúrgicamente vinculando a las secuencias reguladoras en un localización genómica. Estas células pueden ser administradas a nivel local o sistémicamente a un sujeto, como un paciente en necesidad de tratamiento.

Los vectores virales, incluyen, por ejemplo, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), poxvirus, herpesvirus, retrovirus y otros diseñados para la terapia genética pueden ser empleados. Los vectores pueden permanecer episomal o pueden integrarse en los cromosomas del sujeto tratado. Un polipéptido FVII modificado puede ser expresado por un virus, que es administra a un sujeto en necesidad de tratamiento. Los vectores virales para la terapia génica son adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), los retrovirus, los lentivirus, virus vaccinia y otros mencionados anteriormente. Por ejemplo, la expresión del adenovirus es bien conocido en el arte y la producción de adenovirus y los métodos de administración también son bien conocidos. Los serotipos de adenovirus están disponibles, por ejemplo, de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Los adenovirus pueden usarse ex vivo, por ejemplo, se aislaron las células de un paciente en necesidad de tratamiento, y transducidas con un polipéptido FVII modificado que expresan un vector adenovirus. Después de un período de cultivo adecuado, las células transducidas se administran a un sujeto, a nivel local y/o sistémico. Alternativamente, el polipéptido FVII modificado que expresa adenovirus aislados y formulado en un portador farmacéuticamente aceptable, para la entrega de una cantidad terapéuticamente efectiva para prevenir, tratar o aliviar una enfermedad o condición de un sujeto. Normalmente, las partículas de adenovirus se entrega en una dosis que va desde 1 partícula a 1014 partículas por kilogramo de peso del sujeto, por lo general entre 106 o 108 partículas a 1012 partículas por kilogramo de peso del sujeto. En algunas situaciones es

252

deseable contar con una fuente de ácido nucleico con un agente que ataca las células, como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la célula o la superficie de la célula objetiva, o un ligando para un receptor en la célula objetiva. El FVII también puede ser objeto de entrega en tipos de células específicas. Por ejemplo, los vectores de adenovirus que codifican los polipéptidos FVII pueden ser utilizados para la expresión estable en células que no se dividen, como las células del hígado (Margaritis et al. (2004) J Clin Invest 113:1025-1031). En otro ejemplo, los vectores virales o no virales de codificación de polipéptidos FVII pueden ser transducidos en células aisladas para su entrega posterior. Los tipos de células adicionales para la expresión y la entrega de FVII podrían incluir, pero no están limitados a, los fibroblastos y células endoteliales.

Las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en los cromosomas artificiales y otros vectores virales. Los cromosomas artificiales, tales como ACES (véase, Lindenbaum et al. (2004) Nucleic Acids Res. 32 (21): e172) pueden ser diseñados para codificar y expresar la isoforma. En resumen, los cromosomas artificiales de mamíferos (MACs) proporcionan un medio para introducir grandes cargas de la información genética en la célula en un formato de replicación autónoma, sin integración. Único entre los Macs, el ADN satélite de mamíferos basado en cromosomas artificiales de Expresión (ACE) puede ser reproducible generando de nuevo las líneas celulares de diferentes especies y fácilmente purificado de los cromosomas de las células del huésped. Los ACE purificados de mamíferos pueden ser re-introducidos en una

254
253

variedad de líneas celulares de receptores en donde se han mantenido de forma estable por largos períodos en ausencia de presión selectiva mediante un sistema de ECA. Con este enfoque, la carga específica de uno o dos genes objetivos se ha logrado en LMTK (-) y las células CHO. Otro método para la introducción de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos FVII modificados, es un técnica de reemplazamiento de genes en dos pasos en levadura, a partir de un genoma completo de adenovirus (AD2; Ketner et al. (1994) PNAS 91: 6186-6190) clonado en un cromosoma artificial de levadura (YAC) y un plásmido que contiene secuencias de adenovirus para apuntar a una región específica en el clon YAC, un cartucho de expresión para el gen de interés y un marcador de selección positiva y negativa. Los centros de actividades juveniles son de particular interés ya que permite la incorporación de genes más grandes. Este enfoque puede ser usado para la construcción de vectores de virus adeno-basados teniendo ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los polipéptidos FVII modificados descritos de transferencia de genes a las células de mamíferos o todos los animales.

Los ácidos nucleicos se pueden encapsular en un vehículo, como un liposoma o pueden ser introducidos en las células, como una célula bacteriana, en particular, una bacteria atenuada o introducida en un vector viral. Por ejemplo, cuando se emplean los liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de la membrana de la célula de superficie asociada con la endocitosis puede ser utilizada para la orientación y/o para facilitar la captación, por ejemplo, de proteínas de la cápside o fragmentos trópicos de estos de un tipo

de célula en particular, los anticuerpos de las proteínas que se someten a la internalización en el ciclo, y las proteínas que apuntan una localización intracelular y mejoran la semivida intracelular.

Para los métodos ex vivo e in vivo, las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido FVII modificado se introduce en las células que son de un donante adecuado o el sujeto a tratar. Las celdas en las que un ácido nucleico se puede introducir a los efectos de la terapia, por ejemplo, el tipo de células adecuadas para la enfermedad o condición a tratar, incluyendo pero no limitado a las células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos, las células de la sangre como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; las células madre o progenitoras diferentes, en particular, madre hematopoyéticas o las células progenitoras, por ejemplo, como las células madre obtenidas de la médula ósea , la sangre del cordón umbilical, la sangre periférica, hígado fetal, y otras fuentes de la misma.

Para el tratamiento ex vivo, las células de un donante compatible con el sujeto a ser tratado o se remueven las células de sujeto a tratar, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas son administradas al sujeto. El tratamiento incluye la administración directa, como, por ejemplo, encapsulado dentro de las membranas porosas, que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, los números de patentes EE.UU. 4.892.538 y 5.283.187 las cuales están incorporadas en la presente por referencia en su totalidad). Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en

257
255
271

células de mamíferos in vitro incluyen el uso de liposomas catiónicos y los lípidos (por ejèmplo, DOTMA, droga y DC-Chol) electroporación, microinyección, la fusión celular, DEAE dextrano, y métodos de precipitación de fosfato de calcio. Los métodos de entrega de ADN pueden ser utilizados para expresar los polipéptidos FVII modificados in vivo. Tales métodos incluyen la entrega de liposomas de los ácidos nucleicos y la entrega de ADN desnudo, como la distribución local y sistémica como el uso de la electroporación, el ultrasonido y la entrega de fosfato de calcio. Otras técnicas incluyen la micro inyección, la fusión celular, los cromosomas de transferencia génica mediada, transferencia génica de micro células mediadas por la fusión esferoplasto.

La expresión in vivo de un polipéptido FVII modificado puede vincularse a la expresión de moléculas adicionales. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido FVII modificado puede vincularse con la expresión de un producto citotóxico, como en un virus de la ingeniería o expresado en un virus de la citotóxicos. Estos virus pueden ser dirigidos a un determinado tipo celular que es un blanco para un efecto terapéutico. El polipéptido FVII modificado expresado puede ser utilizado para mejorar la citotoxicidad de los virus.

La expresión in vivo de un polipéptido FVII modificado puede incluir operativamente la vinculación de un polipéptido FVII modificado que codifica la molécula de ácido nucleico a secuencias específicas de regulación, tales como una célula específica de tejido o promotor específico. Los polipéptidos FVII modificados también pueden expresarse de vectores que infectan específicamente y/o reproducen tipos de células de destino y/o tejidos. Los

257

promotores inducibles se puede utilizar para regular selectivamente la expresión de los polipéptidos FVII modificados. Un sistema de expresión regulable ejemplar es el sistema de expresión de genes de doxiciclina inducible, que se ha utilizado para regular la expresión de FVII recombinante (Srour et «/. (2003) Thromb Haemost. 90 (3): 398-405).

Las moléculas de ácido nucleico, como los ácidos nucleicos desnudos o en vectores, los cromosomas artificiales, los liposomas y otros vehículos pueden ser administrados a los sujetos 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 puede ser dirigida a una célula.

La administración también puede ser directa, como por la administración de un vector o de las células que normalmente se dirige a una célula o tejido. Por ejemplo, las células tumorales y la proliferación se puede orientar en la expresión in vivo de polipéptidos FVII modificados. Las células utilizadas para la expresión in vivo de un polipéptido FVII modificado también incluyen las células autólogas para el paciente. Estas células pueden ser removidas de un paciente, luego introducir los ácidos nucleicos para la expresión de un polipéptido FVII modificado, y luego administradas a un paciente, como por inyección o injerto.

I. Usos Terapéuticos

Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser utilizados para el tratamiento de cualquier condición por la que se emplea FVII

recombinante. Por lo general, estos tratamientos son aquellos en los que se desea aumentar la coagulación, como el aumento de las respuestas de la hemostasia. Los polipéptidos FVII modificados tienen una actividad terapéutica sola o en combinación con otros agentes. Los polipéptidos modificados del presente documento están diseñados para mantener la actividad terapéutica, pero presentan propiedades modificadas, en particular una mayor resistencia a TFPI, el aumento de la resistencia a la AT-III, el aumento de la actividad catalítica, el aumento de vida media y/o el aumento obligatorio y/o afinidad por las plaquetas activadas. Estas propiedades modificadas, por ejemplo, puede mejorar la eficacia terapéutica de los polipéptidos debido a la actividad coagulante del aumento de los polipéptidos FVII modificados. Esta sección proporciona ejemplares de los usos y métodos de administración. Estas terapias descritas son ejemplares y no limitan las solicitudes de polipéptidos FVII modificados.

Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser utilizados en diferentes terapéuticas, así como los métodos de diagnóstico en el que se emplea FVII. Estos métodos incluyen, pero no limitado a, los métodos de tratamiento de las condiciones fisiológicas que los médicos describen y enumeran a continuación. Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden exhibir la mejora de las actividades in vivo y efectos terapéuticos en comparación con el tipo salvaje FVII, como la reducción de dosis para lograr el mismo efecto, y otras mejoras en la administración y el tratamiento, como administraciones menores y/o menos frecuentes, la

disminución de la efectos secundarios y el aumento de los efectos terapéuticos. Aunque se entiende que los polipéptidos FVII modificados pueden ser administrados como un zimógeno FVII (es decir, la forma de cadena simple), normalmente los polipéptidos FVII modificados del presente documento son administrados en forma activa de dos cadenas, por ejemplo, auto activación o la activación de factores de la coagulación, tal como durante la purificación. En particular, los polipéptidos FVII modificados están destinados al uso en los métodos terapéuticos en los que FVII se ha utilizado para el tratamiento. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a, los métodos de tratamiento de las enfermedades y trastornos, tales como, pero no limitados a, los trastornos de la coagulación sanguínea, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilias, tales como la hemofilia A, hemofilia B y deficiencia de factor VII, y trastornos de la sangre adquirida, tales como la deficiencia de factor VII adquirido causado por la enfermedad del hígado. Los polipéptidos FVII modificados también pueden ser utilizados en el tratamiento de las enfermedades y trastornos hemorrágicos, tales como, pero no limitados a, trombocitopenia (por ejemplo, debido a los regímenes de quimioterapia), la enfermedad de Von Willebrand, trastornos hereditarios de plaquetas (por ejemplo, la enfermedad de agrupación de almacenamiento como el síndrome de Chediak-Higashi y síndromes de Hermansky-Pudlak, la disfunción de tromboxano A2, la enfermedad de Glanzmann y el síndrome de Bernard-Soulier), síndrome urémico hemolítico y Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria, también conocida como síndrome de Rendu-Osler-Weber, alergia

púrpura (púrpura de Henoch Schonlein) y coagulación intravascular diseminada.

En algunas configuraciones, los sangrados a ser tratados por los polipéptidos FVII se producen en órganos como el cerebro, la región del oído interno, los ojos, hígado, pulmón, tejido del tumor, el tracto gastrointestinal. En otras configuraciones, el sangrado es difuso, como en la gastritis hemorrágica y la profusa hemorragia uterina. Los pacientes con trastornos de la coagulación, como por ejemplo, la hemofilia A y B, a menudo corren el riesgo de complicaciones de sangrado durante la cirugía o traumatismo. Este sangrado también puede manifestarse como hemartrosis aguda (hemorragias en las articulaciones), la artropatía hemofílica crónica, hematomas, (por ejemplo, musculoso, retroperitoneal, sublingual y retrofaríngeo), hematuria (sangre en el tracto renal), hemorragias del sistema nervioso central, hemorragias gastrointestinales (por ejemplo, hemorragias UGI) y hemorragia cerebral, que también pueden ser tratados con polipéptidos FVII modificados. Además, cualquier sangrado asociado con la cirugía (por ejemplo, la hepatectomía), o dental puede ser tratado con polipéptidos FVII modificados. En una configuración, los polipéptidos FVII modificados pueden utilizarse para tratar episodios de sangrado debido a un traumatismo o cirugía, o disminución del recuento o la actividad de las plaquetas, en un sujeto. Los métodos ejemplares para los pacientes sometidos a cirugía son los tratamientos para prevenir la hemorragia y los tratamientos antes, durante o después de cirugías tales como, pero no limitadas a, la cirugía cardiaca, angioplastia, cirugía de pulmón, la

cirugía abdominal, cirugía espinal, cirugía cerebral, cirugía vascular, cirugía dental, o cirugía de trasplante de órganos, incluyendo el trasplante de médula ósea, corazón, pulmón, páncreas o el hígado.

El tratamiento de las enfermedades y condiciones con polipéptidos FVII modificados pueden efectuarse por cualquier vía de administración idónea mediante formulaciones adecuadas como se describe en este documento, incluyendo pero no limitado a, la inyección, pulmonar, oral y de la administración transdérmica. El tratamiento generalmente se efectúa por la administración en bolo intravenoso. Si es necesario, una determinada dosis y la duración y el protocolo de tratamiento pueden ser determinados empíricamente o de forma extrapolada. Por ejemplo, las dosis ejemplares de recombinantes y polipéptidos FVII nativos pueden ser utilizadas como punto de partida para determinar las dosis apropiadas. Por ejemplo, un polipéptido FVII recombinante (rFVIIa) que se ha activado para rFVIIa, NovoSeven ®, ha sido administrado a pacientes con hemofilia A o hemofilia B, que están experimentando un episodio hemorrágico, con una dosis de 90 µg/kg en infusión de bolo de 2 a 5 minutos, logrando un nivel de efectivo en circulación de al menos 2 µg/ml, con una semivida de 2,7 horas. La dosis se repite cada 2 horas hasta que se logre la hemostasia. Los polipéptidos FVII modificados que tienen una mayor actividad coagulante, debido a una mayor resistencia al TFPI, el aumento de la resistencia a la AT-III, el aumento de la actividad catalítica, el aumento de vida media y/o el aumento obligatorio y/o afinidad por las plaquetas activadas, puede ser eficaz en cantidades de dosis reducida y/o frecuencias en

262
261

comparación con el FVII recombinante. Las dosis para el tipo salvaje o sin modificar de polipéptidos FVII pueden ser utilizadas como guía para determinar la dosis de polipéptidos FVII modificados. Los factores como el nivel de actividad y la vida media de los FVII modificados en comparación con el FVII sin modificar pueden ser utilizados en la fabricación de tales determinaciones. Las dosis y regímenes particulares pueden ser determinados empíricamente.

Los niveles de dosificación y regímenes pueden ser determinados con base a las dosis y regímenes conocidos, y si es necesario pueden ser extrapolados basados en los cambios en las propiedades de los polipéptidos modificados y/o pueda ser determinada empíricamente basándose en una variedad de factores. Tales factores incluyen el peso corporal de la persona, la salud general, la edad, la actividad de los compuestos que se emplee, sexo, dieta, tiempo de la administración, la tasa de excreción, la combinación de drogas, la gravedad y la evolución de la enfermedad, la disposición del paciente a la enfermedad, y la sentencia del médico tratante. El ingrediente activo, el polipéptido, por lo general se combina con un portador farmacéuticamente eficaz. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con el material de los portadores para producir una dosis única o multi-forma de dosificación puede variar dependiendo del receptor tratado y el modo particular de administración.

El efecto de los polipéptidos FVII en el tiempo de coagulación de la sangre pueden ser controlados usando alguna de las pruebas de coagulación conocidas en el arte, incluyendo pero no limitado a, todo el tiempo de

protrombina en la sangre (PT), el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), el tiempo de coagulación activado (TCA), el tiempo de recalcificado de coagulación activado, o el tiempo de coagulación de Lee White.

Al mejoramiento de la condición de un paciente, una dosis de mantenimiento de un compuesto o compuestos pueden ser administrados, si es necesario, y la dosificación, la forma de dosificación, o frecuencia de administración, o una combinación de los mismos pueden ser modificados. En algunos casos, un sujeto puede requerir el tratamiento intermitente a largo plazo sobre cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad o se basa en las dosis programadas. En otros casos, las administraciones adicionales pueden ser necesarias en respuesta a los eventos agudos, tales como hemorragia, traumatismo o intervenciones quirúrgicas. Las siguientes son algunas condiciones ejemplares para los que FVII (administrada como FVIIa) se ha utilizado como agente de tratamiento solo o en combinación con otros agentes.

1. **Trastornos congénitos de sangrado**

a. Hemofilia

La hemofilia congénita es un trastorno recesivo de la sangre en el que hay disminución de los niveles de factores de coagulación en el plasma, lo que lleva a la interrupción de la cascada de coagulación y el aumento de tiempo de coagulación. La hemofilia A, que representa aproximadamente el 85% de los casos de hemofilia, resulta de la mutación o mutaciones en el gen del factor VIII en el cromosoma X, que lleve a una deficiencia o disfunción de la proteína

264
263

FVIII. La hemofilia B es causada por una deficiencia o disfunción del factor de coagulación, FIX, generalmente como resultado de mutaciones puntuales o deleciones en el gen FIX en el cromosoma X. La incidencia mundial de la hemofilia A es de alrededor de 1 por cada 5.000 individuos del sexo masculino y 1 caso por cada 25.000 hombres de la hemofilia B. La hemofilia A y B se clasifican como leve, moderada o grave. A nivel plasmático con el 5% -25% del funcionamiento normal del factor VIII o IX se clasifica como leve, 1% -5% es moderada, y menos del 1% es severa. La hemofilia C, conocida a menudo como la deficiencia FXI, es una enfermedad relativamente leve y poco frecuente, que afecta a aproximadamente 1 de cada 100.000 personas en una forma autosómica recesiva.

La hemofilia A y B se manifiestan clínicamente en muchos aspectos. Las heridas y abrasiones pequeñas no resultarán en un sangrado excesivo, pero los traumatismos y cirugías sí. El paciente también tendrá numerosas hemorragias musculares y hematomas. La hemartrosis o hemorragias en las articulaciones es una de las principales complicaciones de la hemofilia, y puede ocurrir de manera espontánea o en respuesta a un trauma. Las articulaciones de bisagra, como la rodilla, el codo y el tobillo, se ven afectadas con mayor frecuencia. La cadera y el hombro se ven afectados con mucha menos frecuencia como la articulación de rótula tienen más musculatura que los rodea, protegiendo así a más de una lesión. La hemorragia puede causar dolor agudo grave, restringir el movimiento, y dar lugar a complicaciones secundarias, incluyendo la hipertrofia sinovial. Además, la hemorragia recurrente en las

articulaciones puede causar sinovitis crónica, que puede causar daño en las articulaciones, destruyendo la membrana sinovial, los cartílagos y los huesos. Las hemorragias de amenaza de vida, como la hemorragia intracraneal y hemorrágia en el sistema nervioso central, también afecta a los sujetos con hemofilia. La hemorragia intracraneal se produce en aproximadamente el 10% de los pacientes con hemofilia severa, resultando en un 30% la tasa de mortalidad. En contraste, la hemofilia C es más leve. Las hemorragias espontáneas son raramente vistas, y el sangrado en las articulaciones, los tejidos blandos y músculos, también es poco común. El sangrado es generalmente tratado con transfusión de plasma fresco congelado (PFC), terapia de reemplazo de FXI, o, para el tratamiento tópico, tratamiento de heridas externas o extracciones dentales, cola de fibrina.

El tratamiento más común para la hemofilia A o B es la terapia de reemplazo, en la que el paciente se le administra FVIII o FIX. Las formulaciones están disponibles comercialmente, como derivados del plasma o de productos recombinantes, con proteínas recombinantes, siendo el tratamiento de elección en pacientes no tratados previamente. Aunque estas terapias pueden ser muy exitosas, surgen complicaciones si el paciente desarrolla inhibidores del factor VIII o de nueva administración de factor IX. Los inhibidores son anticuerpos IgG, la mayoría de la subclase IgG4, que reaccionan con FVIII o FIX e interfieren con la función pro-coagulante. Los inhibidores afectan a 1 de cada 5 pacientes con hemofilia severa A. La mayoría de los sujetos desarrollan estos inhibidores poco después de la administración

266

de las primeras infusiones del factor VIII, que a menudo en la infancia, aunque los sujetos desarrollan más adelante en la vida. Los inhibidores también afectan a aproximadamente 1 de cada 15 personas con insuficiencia renal con hemofilia A leve o moderada. Estos inhibidores se desarrollan generalmente en la edad adulta y no sólo destruyen la administración de exógeno FVIII, sino que también destruyen el endógeno FVIII. Como resultado, los hemofílicos leves y moderados se intensifican. Clínicamente, los pacientes con hemofilia A con inhibidores de la respuesta se clasifican en altas y bajas de acuerdo a la fuerza de la respuesta de memoria que sufren cuando están expuestos a la re-FVIII. Los inhibidores afectan cerca de 1 en 100 pacientes con hemofilia B. En la mayoría de los casos, los inhibidores se desarrollan después de las primeras infusiones del factor terapéutico IX y puede ir acompañado de reacciones alérgicas.

Los polipéptidos FVII modificados aquí presentados pueden ser utilizados para tratar a pacientes con hemofilia, en particular, los pacientes hemofilicos con inhibidores. Un producto de FVIIa recombinante (NovoSeven, Novo Nordisk) ha sido aprobado y autorizado para el tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A o B con inhibidores de FVIII o FIX y para la prevención de hemorragias en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en la hemofilia A o B de pacientes con inhibidores FVIII o FIX. El tratamiento con rFVIIa aumenta la generación de trombina sin pasar por el requisito de la FVIIIa y/o FIXA. La coagulación se inicia en el sitio de la lesión por la interacción de rFVIIa con TF, lo que resulta en la activación

262

de FX inicial, la generación de trombina y la activación de las plaquetas. La coagulación completa de rFVIIa puede ser efectuado por la TF-dependiente y mecanismos TF-independientes, donde parte de la trombina generada puede ser el resultado de la activación directa de los FX en las plaquetas activadas por rFVIIa, que a su vez se une a las plaquetas activadas a través de interacciones de baja afinidad con las membranas de fosfolípidos.

Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser utilizados en terapias para la hemofilia, incluyendo el tratamiento de episodios hemorrágicos y la prevención de hemorragias en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos. Los polipéptidos FVII modificados ofrecen una mayor resistencia a la TF /inhibidor de FVIIa complejo.

El TFPI aumenta la resistencia a la AT-III, aumenta la actividad catalítica, aumenta la vida media y/o aumenta la afinidad de las plaquetas activadas. Los polipéptidos FVII por lo tanto puede mostrar una mayor actividad coagulante en una forma dependiente de TF (como a través de una mayor resistencia al TFPI), y/o una manera de TF independiente (por ejemplo, a través de una mayor unión y/o afinidad por las plaquetas activadas). Así, los polipéptidos FVII modificados se pueden utilizar para ofrecer terapias más activas de la hemofilia. Ejemplos de las mejoras terapéuticas utilizando polipéptidos FVII mejorados incluyen, por ejemplo, pero no están limitadas a, las dosis bajas, administraciones frecuentes menores, disminución de los efectos secundarios, y el aumento de los efectos terapéuticos.

260
~~267~~
~~283~~

Los polipéptidos FVII modificados normalmente se administran como polipéptidos activos FVII (FVIIa). Los polipéptidos FVII modificados se pueden probar para la eficacia terapéutica, por ejemplo, mediante el uso de modelos animales. Por ejemplo, los anticuerpos inducidos por los ratones hemofílicos, o cualquier otro modelo de la enfermedad conocida por la hemofilia, puede ser tratada con polipéptidos FVII modificados. La progresión de los síntomas de la enfermedad y los fenotipos se monitorea para evaluar los efectos de los polipéptidos FVII modificados. Los polipéptidos FVII modificados también se pueden administrar a personas como en los ensayos clínicos para evaluar la eficacia in vivo en comparación con los controles de placebo y/o los controles utilizando FVII sin modificaciones.

b. **Deficiencia de FVII**

La deficiencia del factor FVII es un trastorno autosómico recesivo de la coagulación que afecta a aproximadamente a 1 de cada 500.000 personas. La deficiencia de FVII puede ser clínicamente leve, moderada o severa, con deficiencia leve a moderada que se caracteriza por el aumento de la hemorragia después de la cirugía y trauma. Los pacientes con deficiencia de FVII severa (menos del 1% FVII actividad) experimentan síntomas similares a la hemofilia. Por ejemplo, sujetos deficientes de FVII, son propensos a las hemorragias articulares, hemorragias de las articulaciones, sangrado nasal espontáneo, hemorragia gastrointestinal, hemorragia del tracto urinario. La hemorragia intracerebral y hemorragias musculares también han sido reportadas, mientras que las mujeres pueden experimentar graves menorragia

269

(sangrado menstrual abundante). El tratamiento puede efectuarse mediante la terapia de reemplazo. Un producto FVIIa recombinante (NovoSeven ®, Novo Nordisk) ha sido aprobado y autorizado para el tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con deficiencia congénita FVII y para la prevención de hemorragias en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con deficiencia congénita FVII. Por lo tanto, los polipéptidos FVII modificados aquí también se pueden utilizar. Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser utilizados en el tratamiento de episodios hemorrágicos y la prevención de hemorragias en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con deficiencia de FVII. Por ejemplo, un paciente neonatal que presenta deficiencia de FVII grave con hemorragia intracraneal puede ser administrado con polipéptidos FVII modificados mediante bolo intravenoso para la realizar la coagulación y mantener la hemostasia. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

c. Otros

Otros trastornos de la coagulación pueden ser tratados con los polipéptidos FVII del presente documento para promover la coagulación. Las deficiencias congénitas de los factores V y X también se presentan con mayor tiempo de coagulación en la sangre y potencialmente pueden ser tratados con la administración de dosis terapéuticas de FVII. Por ejemplo, un paciente con deficiencia de factor X puede ser administrado con rFVIIa para controlar la hemorragia asociada con la esplenectomía (Boggio et al. (2001) Br J Haematol

270
269

112:1074-1075). Los episodios de sangrado espontáneo y de cirugía asociados con la enfermedad de von Willebrand (VWD) también pueden ser tratados con los polipéptidos FVII modificados aquí facilitados. El VWD es un trastorno de la coagulación causado por un defecto o deficiencia de la proteína que coagula la sangre, factor de Von Willebrand (FVW), y se estima que ocurre en 1% al 2% de la población. Los pacientes con hematoma VWD con facilidad, tienen frecuentes sangrados de nariz, sangrado después de la extracción dental, amigdalectomía u otra cirugía, las mujeres y los pacientes pueden tener un aumento del sangrado menstrual. Los polipéptidos FVII modificados pueden ser utilizados para aliviar las hemorragias espontáneas y de cirugía en pacientes VWD (von Depka et al. (2006) Blood Coagul fibrina 17:311-316). Otros aspectos relacionados con los trastornos de sangrado con relación a las plaquetas, tales como, por ejemplo, Enfermedad de Glanzmann y síndrome de Hermansky-Pudlak, también se asocian con la coagulación de la reducción de la actividad endógena. El exceso de sangrado espontáneo o asociado a la cirugía en pacientes con trastornos de la coagulación relacionados con las plaquetas también puede ser controlado por las dosis terapéuticas de los polipéptidos FVII modificados. Por ejemplo, un paciente con Enfermedad de Glanzmann sometido a cirugía puede ser tratado antes, durante y/o después de la cirugía con los polipéptidos FVII modificados para prevenir la pérdida de sangre importante (Van Buuren, et al. (2002) Dig Dis Sci 47:2134-2136). Generalmente, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

271
220

2. Trastornos de sangrado adquiridos

a. Trombocitopenia adquirida por quimioterapia

Los trastornos de sangrado también pueden ser adquiridos, y no solo pueden ser congénitos. Por ejemplo, el tratamiento de quimioterapia, tal como el tratamiento para la leucemia y otros cánceres, puede resultar en trombocitopenia. Esto es probablemente debido a una pérdida de la producción de plaquetas en la médula ósea de los pacientes que reciben quimioterapia, y normalmente se produce de 6-10 días después de la medicación. El tratamiento de la trombocitopenia suele ser adquirido por las plaquetas, glóbulos rojos o la transfusión de plasma, que sirve para prevenir el sangrado espontáneo anormal que puede ser resultado de la deficiencia de plaquetas. El sangrado en pacientes con trombocitopenia inducida por quimioterapia, o cualquier otra adquirida o trombocitopenia congénita, también puede ser controlado por la administración de cantidades terapéuticas de los polipéptidos FVII modificados aquí facilitados. Por ejemplo, un paciente con hemorragia trombocitopénica incontrolada, como en el tracto gastrointestinal, puede administrarse una inyección intravenosa en bolo de una cantidad terapéutica de polipéptido FVII para detener una hemorragia (Gerotziafas et al. (2002) Am J Hematol 69:219 - 222). Generalmente, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa)

b. Otras coagulopatías

Otras coagulopatías adquiridas pueden ser tratadas con los polipéptidos FVII modificados aquí contenidos. La coagulopatía puede ser resultado de

272
271

condiciones de, incluyendo pero no limitado a, fallo hepático fulminante (FHF, como la causada por las drogas hepatotóxicas, toxinas, enfermedades metabólicas, enfermedades infecciosas y la isquemia), otras enfermedades del hígado, incluyendo cirrosis y las enfermedades asociadas con la enfermedad de Wilson, la deficiencia en la vitamina K (como la causada por el tratamiento antibiótico o la dieta), el síndrome urémico hemolítico, trombocitopenia trombótica (TTC) y coagulopatía intravascular diseminada (CID). El tratamiento convencional es generalmente por la transfusión de plasma, glóbulos rojos (RBC), o plaquetas, pero puede ser infructuosa. En una configuración, los polipéptidos FVII modificados pueden ser administrados a un paciente con FHF sometido a procedimientos invasivos para prevenir el sangrado. El tratamiento convencional con plasma fresco congelado (PFC) a menudo no tiene éxito y puede requerir grandes cantidades de plasma, produciendo una sobrecarga de volumen y anasarca (una infiltración generalizada de líquido del edema en el tejido conjuntivo subcutáneo). El tratamiento con cantidades terapéuticas de polipéptidos FVII modificados mediante bolo intravenoso durante, antes o después de la cirugía invasiva, como, por ejemplo, la biopsia hepática o trasplante de hígado, pueden prevenir el sangrado y establecer la hemostasia en pacientes con FHF. El paciente puede ser monitoreado por el PT de la sangre para determinar la eficacia del tratamiento (Shami et al. (2003) Liver Transpl 9:138-143). En otra configuración, el FVII puede ser administrado a un paciente con hemorragia grave asociada con coagulopatía, como por ejemplo, la hemorragia intraabdominal grave por cesárea asociadas con disfunción

223

hepática y la CID, que no respondió a las transfusiones convencionales de infusiones (Moscardo et al. (2001) Br J Haematol 113:174 - 176). Además, los polipéptidos FVII modificados pueden ser utilizados para tratar la coagulopatía en los pacientes neonatales y pediátricos. En una configuración particular, los pacientes neonatales y pediátricos no responden al tratamiento convencional, como la infusión de glóbulos rojos y plaquetas. Por ejemplo, los recién nacidos con hemorragia pulmonar severa asociada con aumento de tramitación que no responden a la transfusión de glóbulos rojos y de plaquetas puede ser administrados con polipéptidos FVII modificados para disminuir el PT y el establecimiento de la hemostasia (Olomu et al. (2002) J Perinatol 22:672-674). Los polipéptidos FVII modificados del presente documento muestran la actividad de coagulación mejorada en comparación con polipéptidos FVII sin modificaciones, por lo que se puede administrar, por ejemplo, en dosis más bajas, con menos frecuencia y con menos reacciones adversas. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

c. Sangrado adquirido por trasplante

El sangrado severo después de un trasplante de médula ósea (BMT) y el trasplante de células madre (SCT) es relativamente común y potencialmente mortal asociado con estos procedimientos, debido a la reducción de las plaquetas. Por ejemplo, la hemorragia alveolar difusa (DAH) es una complicación pulmonar de trasplante de médula ósea, con una incidencia estimada de 1.21% en la población de trasplantes, y una tasa de mortalidad de

274
273

60-100%. El tratamiento convencional de episodios de sangrado incluye corticosteroides como tratamiento y transfusión de plasma, plaquetas y/o de glóbulos rojos, aunque estos son en gran parte inservibles con una tasa global de mortalidad de aproximadamente el 50% (Hicks et al. (2002) Bone Marrow Transpl 30:975-978). La administración de FVII mediante bolo intravenoso, con o sin tratamiento concomitante con corticosterioids y/o la infusión de plaquetas, se puede realizar para tratar DAH y establecer la hemostasia (Hicks et al. (2002) Bone Marrow Transpl 30:975-978). Los polipéptidos FVII modificados del presente documento muestran la actividad de coagulación mejorada en comparación con polipéptidos FVII sin modificaciones, por lo que podría ser administrado, por ejemplo, en dosis más bajas, menos frecuentemente, sobre una duración de tratamiento más corto y con menos reacciones adversas para la misma actividad biológica y la eficacia. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

d. **Sangrado inducido por terapia anticoagulante**

Los pacientes sometidos a tratamientos anticoagulantes para el tratamiento de condiciones, tales como tromboembolismo, pueden presentar episodios de sangrado agudo en la administración de anticoagulantes, como la warfarina, heparina y el fondaparinux, o el desarrollo de trastornos hemorrágicos como resultado del uso a largo plazo de estas terapias. Los tratamientos para los episodios de sangrado típicamente incluyen la administración de procoagulantes, tales como la vitamina K, plasma, exógenos FIX, y protaminas para neutralizar la heparina. La administración de exógenos

FVII también se puede realizar para neutralizar el efecto de los anticoagulantes, el aumento de PT , TTPa, y/o otros marcadores de coagulación y establecer la hemostasia (Deveras et al (2002) Ann Inten Med 137:884-888). Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser utilizados en los tratamientos para controlar los episodios hemorrágicos en pacientes con trastornos de la coagulación adquiridos debido a los tratamientos anticoagulantes. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

e. **Hemofilia adquirida**

Los inhibidores del factor VIII pueden desarrollarse de forma espontánea en los individuos sanos, lo que resulta en una condición conocida como "hemofilia adquirida". La hemofilia adquirida es una enfermedad rara, con una incidencia anual de 0,2-1,0 por millón de población. Los anticuerpos son principalmente anticuerpos IgG4, que, cuando se unen a FVIII, inhiben la actividad de FVIII al interferir con la disociación de la trombina, con el factor de interacción de von Willebrand y/o de fosfolípidos vinculantes. Esto da lugar a una hemorragia peligrosa para la vida en aproximadamente el 87% de los pacientes afectados. Los sitios más comunes de sangrado son la piel, mucosas, músculos y retroperitoneo, en contraste con los pacientes con hemofilia hereditaria que sangran principalmente en las articulaciones y los músculos. La hemofilia adquirida puede ser tratada con un concentrado complejo de protrombina activado o de factor VII activado recombinante (NovoSeven ®, Novo Nordisk) para controlar los episodios de sangrado. Los

274
275

polipéptidos FVII modificados del presente documento muestran la actividad de coagulación mejorada en comparación con polipéptidos FVII sin modificaciones, por lo que se puede administrar, por ejemplo, en dosis más bajas, menos frecuentemente, sobre una duración de tratamiento más corto y con menos reacciones adversas para la misma actividad biológica y la eficacia. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

3. **Sangrado por trauma y cirugía**

Los polipéptidos FVII pueden utilizarse como terapia para el tratamiento de hemorragias asociadas con la pérdida de sangre perioperatoria y traumática en los sujetos con los sistemas de coagulación normal. Por ejemplo, los polipéptidos FVII pueden ser administrados a un paciente para promover la coagulación y reducir la pérdida de sangre asociada con la cirugía y, además, reducir la necesidad de transfusión de sangre. En una configuración, los polipéptidos FVII pueden ser administrados a los sujetos sometidos a prostatectomía retropúbica. La prostatectomía retropúbica se asocia a menudo con gran pérdida de sangre y la necesidad posterior de una transfusión. Los sujetos sometidos a cirugía o similares pueden tener un bolo intravenoso de una cantidad terapéutica de FVII en la fase operativa del principio para reducir la pérdida perioperatoria de sangre mediante el aumento de la coagulación en el sitio de la cirugía. La reducción en la pérdida de sangre resulta en la eliminación de la necesidad de transfusión de sangre en estos pacientes (Friederich et al. (2003) Lancet 361 :201-205). Los polipéptidos FVII pueden ser

272
296

administrados a pacientes con coagulación normal sometidos a otros tipos de cirugías para realizar una hemostasia rápida y evitar la pérdida de sangre. Ejemplos no limitativos de procedimientos quirúrgicos en los que FVII, por lo general se administra en forma activa, es decir (FVIIa), pueden utilizar una terapia para reducir la hemorragia perioperatoria que incluyen, pero no se limitan a, la cirugía de la válvula cardíaca (Al Douri, et al. (2000) Blood Coag Fibrinol 1 1: S121-S127), el reemplazo de la válvula aórtica (Kastrup et al la cirugía de cáncer. (2002) Ann Thorac Surg 74:910-912), la resección de hemangiopericitoma recurrentes (Gerlach et al. (2002) J Neurosurg 96:946-948), (Sajdak et al. (2002) Eur J Gynecol Oncol 23 :325-326), y la cirugía en las úlceras duodenales (Vlot et al. (2000) Am J Med 108:421-423). El tratamiento con FVII puede promover la hemostasia en el sitio de la cirugía y reducir o prevenir la pérdida de sangre, reduciendo o suprimiendo la necesidad de transfusión. Los polipéptidos FVII modificados del presente documento están diseñados para mostrar la actividad de coagulación mejorada en comparación con polipéptidos FVII sin modificaciones, por lo que podría ser administrado, por ejemplo, en dosis más bajas, con menos frecuencia y con menos reacciones adversas. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

Los polipéptidos del factor VII también pueden ser utilizados para promover la coagulación y prevenir la pérdida de sangre en pacientes con lesiones traumáticas. El trauma se define como una lesión en el tejido vivo por un agente extrínseco, y es la cuarta causa de muerte en los Estados Unidos. El

270

trauma es clasificado como un traumatismo cerrado (lo que produce la compresión interna, daño de órganos y hemorragia interna) o un traumatismo penetrante (como consecuencia de un agente que penetra en el cuerpo y la destrucción de los tejidos, vasos y órganos, provocando una hemorragia externa). El trauma puede ser causado por varios eventos, incluyendo pero no limitado a, accidentes de tráfico (que causa traumas contundentes y/o traumas penetrantes), heridas de bala (que causa traumatismo penetrante), heridas punzantes (con la penetración causar trauma), accidentes de maquinaria (que causa la penetración y/o un traumatismo cerrado) y caídas desde una altura considerable (que causa la penetración y/o traumatismo cerrado). La hemorragia no controlada como resultado de un trauma es responsable de la mayor parte de la mortalidad asociada. La coagulopatía difusa es una complicación relativamente frecuente asociada a pacientes con trauma, se producen hasta en el 25-36% de los sujetos. La coagulopatía puede desarrollarse poco después de la lesión, como resultado de una variedad de factores tales como la dilución y el consumo de las plaquetas y los factores de coagulación, la fibrinólisis, la acidosis y la hipotermia. El manejo convencional consiste en la terapia de reemplazo de la transfusión de plasma fresco congelado (PFC), plaquetas, glóbulos rojos y/o crioprecipitado, corregir la acidosis, y el tratamiento de la hipotermia. Estos pasos son a menudo 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 traumatismos.

279

278

Por ejemplo, un paciente con una lesión de bala que presenta masivo sangradp, además de la intervención quirúrgica, se administrará FVII para controlar la hemorragia coagulapática (KENET et al. (1999) Lancet 354:1879). La terapia coagulante con FVII puede reducir eficazmente la pérdida de sangre y la hemorragia en pacientes con trauma contuso y penetrante (Rizoli et al. (2006) Crit Care 10: R178). Los polipéptidos FVII modificados del presente documento están diseñados para mostrar la actividad de coagulación mejorada en comparación con polipéptidos FVII sin modificaciones, por lo que podría ser administrado, por ejemplo, en dosis más bajas, con menos frecuencia y con menos reacciones adversas. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

J. Terapias de Combinación

Cualquiera de los polipéptidos FVII modificados aquí descrito se puede administrar en combinación con, antes de, de manera intermitente o con posterioridad a otros agentes terapéuticos o procedimientos, incluyendo pero no limitado a, productos biológicos de otros compuestos de pequeñas moléculas y la cirugía. Para cualquier enfermedad o condición, incluyendo todos los ejemplos anteriores, para lo cual FVII (incluyendo FVIIa y rFVIIa) se indica o se ha utilizado y que otros agentes y los tratamientos están disponibles, FVII se puede utilizar en combinación con ellos. Por lo tanto, los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser igualmente utilizados. Dependiendo de la enfermedad o condición a tratar, las combinaciones incluyen, pero no se limitan a, la combinación con otros factores

280

de la coagulación plasmática purificada o recombinante, procoagulantes, como la vitamina K, derivado de la vitamina K y los inhibidores de la proteína C, plasma, plaquetas, células rojas de la sangre y los corticosteroides.

K. Artículos de fabricación y equipos (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 de la misma puede ser empaquetado como artículos de fabricación que contienen material de embalaje, una composición farmacéutica que es eficaz para el tratamiento de una la enfermedad o trastorno hemostático, y una etiqueta que indica el polipéptido FVII modificado o molécula de ácido nucleico se va a utilizar para el tratamiento de la enfermedad o trastorno hemostático.

Los artículos de fabricación, que se proveen en el presente documento contienen materiales de embalaje. Los materiales de embalaje para su uso en el envasado de productos farmacéuticos son bien conocidos por los de habilidad en el arte. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.352, cada una de las cuales se incorporan al presente documento en su totalidad. Ejemplos de materiales de embalaje farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, ampollas, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, frascos, envases, jeringas, botellas, y cualquier material de embalaje adecuado para una formulación y un modo deseado de administración y tratamiento. Una amplia gama de formulaciones de los compuestos y composiciones previstos se contempla como una gran variedad

281
280
282

de tratamientos para cualquier enfermedad o trastorno hemostático. Los polipéptidos FVII modificados y las moléculas de ácido nucleico también se pueden proporcionar como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica que aquí descrita en este documento e incluir un elemento para la administración. Por ejemplo, un FVII modificado puede ser suministrado con un dispositivo para la administración, como una jeringa, un inhalador, un vaso de dosificación, un gotero, o un aplicador. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones para la aplicación, incluyendo las dosis, los regímenes de dosificación y las instrucciones de los modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica aquí descrita y un elemento para el diagnóstico. Por ejemplo, estos kits pueden incluir un elemento para medir la concentración, la cantidad o la actividad de FVII o un sistema regulado de FVII de un sujeto.

Los siguientes ejemplos se incluyen sólo para fines ilustrativos y no tienen por objeto limitar el alcance de la invención.

L. Ejemplos

Ejemplo 1

In silico factor de generación de variantes VII con mayor resistencia a TFPI

A. Modelación de la interacción entre el factor VII y TFPI

Los modelos computarizados de la interacción entre el factor VII y su inhibidor natural, el primer dominio Kunitz (KI) sobre el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPL)-1 (TFPI-1 K1) se realizó para determinar el contacto con

282
281

residuos de aminoácidos en la interfaz del sitio de interacción. La información disponible al público desde el banco de datos de proteínas (rcsb.org /pdb/) se utilizó para crear el modelo de homología. Ni la estructura de cristal para TFPI-1 K1 sola, ni el del complejo cuaternario entre TF/FVIIa/TFPI-1/FXa, aún no han sido resueltos. En cambio, se realizaron modelos computarizados usando la estructura cristalina 2.1Å del complejo ternario entre TF, FVII y la variante 5L15 de la especie bovina inhibidora de la tripsina pancreática ($BPT1^{5L15}$; PDB código 1FAK_1) como modelo de partida del proceso, seguido de información sobre la estructura cristalina del complejo de la tripsina/TFPI-2 (Figura 6). El $BPTI^{5LI\ 5}$ es una serina proteasa tipo dominio de Kunitz, y muestra una homología a TFPI-1 y a TFPI-2. El primer dominio de Kunitz (K1) de $BPTI^{5LI\ 5}$ (NÚMERO SEQ DE ID: 106) muestra una identidad secuencial primaria del 45% en el primer dominio de Kunitz (K1) (figura 5). Las coordenadas para la estructura de cristal de TFPI-2 K1 fueron extraídas del programa de computador de bases de datos (pdb) del archivo 1TFX del banco de datos de la proteína, que representa la estructura de cristal del complejo de la tripsina /TFPI-2. Las coordenadas de TFPI-2 K1 fueron alineadas sobre las coordenadas tridimensionales de $BPTI^{5LI5}$ de la estructura cristalina de TF/ FVIIA/ $BPTI^{5LI5}$ (archivo 1FAK1 del pdb) usando un programa de alineación de la cadena principal del cuerpo rígido c- ∞ en la habitación del programa PyMol (pymol. scurceforge.net/). El análisis de ajuste de TFPI-2 K1 al modelo por la medición de la pendiente resultante de la desviación de la raíz media cuadrada (RMSD) de menos de 1A. Este indico una alineación precisa entre las dos

203
282

estructuras, y la generación de un modelo confiable de un FVII y de un complejo TFPI-2 K1.

Las cadenas laterales en TFPI-2 K1 que fueron mostradas por el modelo de estar en contacto cercano con la superficie de FVII fueron identificadas y mutagenizadas en silico para corresponder a las cadenas laterales presentes en TFPI-1 K1. Los resultados de esta análisis revelaron una complementariedad electrostática entre el factor VII y TFPI-1 K1 en distintos residuos directamente adyacente al sitio activo (es decir.2^{dos} residuos de la esfera). Los residuos en FVII implicados en la interacción con TFPI-I K1 basado en el anterior análisis homológico son D60, K60a, K60c, T99, R147 y K192 de la enumeración de la quimotripsina, que corresponden a D196, a K197, a K199, a T239, a R290 y a K341, respectivamente, a la enumeración madura de FVII (figura 7). Una evaluación de la interacción modelada indicado que los residuos de glicina en la posición 97 por la enumeración de la quimotripsina (G97), que corresponde a G237 por la enumeración madura de FVII, esta en estrecha proximidad a los residuos del contacto. La modificación en esta posición podría dar como resultado un obstáculo estérico, que rompería la interacción de FVII con TFPI.

B. Mutación in silico del factor VII para proporcionar resistencia creciente a TFPI-K1

Los residuos de aminoácidos situados en o cerca de la interfaz de la interacción de FVII/TFPI-1 K1 fueron identificados como se describe anteriormente. Las variantes de FVII con los cambios del aminoácido fueron

284
288

diseñadas que tanto a) los reemplazos de los contactos electrostáticos complementarios entre FVII y TFPI-1 con los contactos repelen carga-carga y/o b) nieguen contactos electrostáticos positivos por el reemplazo de los residuos cargados en FVII con residuos neutros y/o c) Causen un obstáculo estérico por el reemplazo de residuos que contienen una pequeña cadena lateral con los residuos que contienen cadenas laterales más grandes. Variantes ejemplares están enunciadas en la tabla 9.

Tabla 9. Variantes ejemplares del factor VII

Variante (Numeración de FVII maduro)	Variante (Numeración quimotripsina)	ID	Variante polipéptido SEQ ID NO
D196K	D60K	CB554	18
D196R	D60R	CB555	19
D196A	D60A	CB556	20
D196Y	D60Y	CB601	125
D196F	D60F	CB600	126
D196W	D60W	CB602	127
D196L	D60L	CB603	128
D196I	D60I	CB604	129
K197Y	K60aY	CB561	21
K197A	K60aA	CB559	22
K197E	K60aE	CB558	23
K197D	K60aD	CB557	24
K197L	K60aL	CB560	25
K197M	K60aM	CB599	26
K197I	K60aI	CB595	130
K197V	K60aV	CB596	131
K197F	K60aF	CB597	132
K197W	K60aW	CB598	133
K199A	K60cA	CB564	27
K199D	K60cD	CB562	28
K199E	K60cE	CB563	29
G237W	G97W	CB605	134
G237T	G97T	CB606	135
G237I	G97I	CB607	136
G237V	G97V	CB608	137

284

T239A	T99A	CB565	30
R290A	R147A	CB568	31
R290E	R147E	CB567	32
R290D	R147D	CB566	33
K341E	K192E		34
K341R	K192R	CB569	35
K341Q	K192Q	CB609	138
D196R/R290E	D60R/R147E	CB579	36
D196K/R290E	D60K/R147E	CB580	37
D196R/R290D	D60R/R147D	CB581	38
D196R/ K197E/ K199E	D60R/K60aE/K60cE	CB586	39
D196K/ K197E/ K199E	D60K/K60aE/K60cE	CB587	40
D196R/ K197E/ K199E/R290E	D60R/K60aE/K60cE/R147E	CB588	41
D196R/ K197M/ K199E	D60R/K60aM/K60cE	CB589	42
D196R/ K197M/ K199E/R290E	D60R/K60aM/K60cE/R147E	CB590	43
D196K/K197L	D60K/K60aL	CB610	139
D196F/K197L	D60F/K60aL	CB612	140
D196L/K197L	D60L/K60aL	CB611	141
D196M/K197L	D60M/K60aL	CB613	142
D196W/K197L	D60W/K60aL	CB614	143
D196F/K197E	D60F/K60aE	CB615	144
D196W/K197E	D60W/K60aE	CB616	145
D196V/K197E	D60V/K60aE	CB617	146

Ejemplo 2

Reproducción y expresión de FVII

A. Reproduccion de FVII

Los nucleótidos que codifican los 466 isoformas del amino acido humano FVII polipéptidos precursores (P08709; dispuesto en NÚMERO SEQ de ID: 1) fueron clonado en el vector de expresión mamífero, escritura pCMV (Stratagene; NÚMERO SEQ DE ID: 151), que contiene un promotor del citomegalovirus (CMV). Brevemente, el CBO- 125 (NÚMERO SEQ de ID: 152)

286
285

y CBO-126 (NÚMERO SEQ de ID: 153) los oligonucleótidos fueron utilizados como cebadores delanteros e inversos, respectivamente, para amplificar la secuencia de FVII por PCR usando el cDNA FVII humano (Invitrogen) como la planta. El cebador CBO-125 contuvo un sitio de restricción BamHI (en negrilla), una secuencia de Kozak (doble subrayado), seguida por 18 nucleótidos con homología de 5 pulgadas en el extremo de la secuencia de FVII c ADN (subrayada), incluyendo el codón de iniciación ATG. El cebador de CBO- 126 contiene un sitio de restricción EcoRI (en negrilla), un codón de parada (doble subrayado) y 21 nucleótidos con homología de 3 pulgadas en el extremo de la secuencia de c ADN de FVII (subrayada).

Cebador delantero de CBO- 125

5 ' gcatcateacgtgacggatccgccaccatggtctcccaggccctc 3 '

Cebador traseri de CBO- 126

5 ' Gatcgtaceatacgtgaattcctaggeaaatggggctcgcapgag 3 '

La reacción estándar PCR y las condiciones termo cíclicas fueron utilizadas conjuntamente con el estuche KoD HiFi PCR (biociencias de EMD), según las recomendaciones del fabricante. El producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción de BamH I y de EcoR I y ligado en los sitios de restricción de BamH I y de EcoR I del vector de la escritura pCMV usando las técnicas moleculares estándar. El vector entonces fue transformado en Escherichia coli. Las colonias seleccionadas fueron creciendo y las células bacterianas recogidas para la purificación del plásmido usando las técnicas de la biología molecular de rutina.

287

286

294

B. Generación de variantes de FVII

Las variantes de FVII fueron generadas usando el estuche Sitio-Dirigido de mutagénesis de QuikChangeII XL (Stratagene) según las instrucciones de los fabricantes, con los oligonucleótidos específicamente diseñados que sirvieron como cebadores que incorporaron una mutación concreta en el ADN nuevamente sintetizado. El método de QuikChange implica la amplificación lineal de la platilla de ADN por la polimerasa de alta fidelidad de ADN de PfuUltra. Los cebadores complementarios que incluyen la mutación deseada fueron extendidos durante el uso del ciclo purificador, el vector de escritura pCMV súper enrollado doblemente que contiene la secuencia de cADN clonada de FVII como plantilla. Extensión de los cebadores resultaron en la incorporación de la mutación de interés en las hebras nuevamente sintetizadas, y resultando en un plásmido mutado con las mellas escalonadas. En la siguiente amplificación, el ácido nucleico fue tratado con Dpn I, que digiere las hebras parenterales metiladas del vector de escritura E. coli- derivadas de pCMV. Esto resultó en la "selección" de los plásmidos mutados nuevamente sintetizados, que no eran metilados. El vector del ADN que contenía las mutaciones deseadas fue transformada en el ultra componente de células E. coli XL10-Gold, donde la ligasa bacteriana reparo las mellas y permitió que ocurriera la replicación normal.

Las variantes de FVII con individuales sustituciones de aminoácidos fueron hechas apuntando las posiciones D196, K197, K199, G237, T239, R290 y K341, por la enumeración madura de FVII (correspondiente a D60, a K60a, a

286
287

K60c, a G97, a T99, a R147 y a K192 por la enumeración de la quimotripsina). Las variantes de FVII con múltiples mutaciones en las posiciones D196, K197 y K199, o las mutaciones en las posiciones D196 y K197, también fueron generadas. La secuencia de nucleótidos de uno de los oligonucleótidos de cada pareja de cebadores complementaria fue utilizada para generar las variantes de FVII proporcionadas en la tabla 10. La secuencia correspondiente de tipo salvaje también es mostrada como comparación. La secuencia de 3 bases pares que codifica el sustituido del aminoácido es mostrado con negrilla. Por ejemplo, para generar una variante de FVII que contiene la sustitución D196K (D60K por la enumeración de la quimotripsina; CB554, NÚMERO SEQ DE ID: 18), el oligonucleótido de CBO- 157 D60K, y un oligonucleótido que es complementario a CBO- 157 D60K, fue utilizado el estuche Sitio-Dirigido de mutagénesis de QuickChange II XL para sustituir una secuencia de tipo salvaje de 3 bases pares "gac" con una secuencia de 3 bases pares "aag". El vector mutado que codificaba un polipéptido de la variante de FVII que contenía una sustitución de D196K, luego fue transformado en un ultra componente de células E. coli XL10-Gold.

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para generar variantes de FVII

Posicion Dirigida	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	No SEQ ID
D196 (D60)	D60 wild-type	gcggcccactgtttc**gac**aaaatcaagaactgg	155
	CBO-157 D60K	gcggcccactgtttc**aag**aaaatcaagaactgg	156
	CBO-158 D60R	gcggcccactgtttc**agg**aaaatcaagaactgg	157
	CBO-159 D60A	gcggcccactgtttc**gcg**aaaatcaagaactgg	158
	CBOLH-59 D60F	gcggcccactgtttc**ttt**aaaatcaagaactgg	186

	CBOLH-60 D60Y	gcggcccactgtttc**ata**aaaatcaagaactgg	187
	CBOLH-61 D60W	gcggcccactgtttc**tgg**aaaatcaagaactgg	188
	CBOLH-62 D60L	gcggcccactgtttc**gag**aaaatcaagaactgg	189
	CBOLH-63 D60I	gcggcccactgtttc**atc**aaaatcaagaactgg	190
K197 (K60a)	K60a wild-type	gcccactgtttcgac**aaa**atcaagaactggagg	159
	CBO-160 K60aD:	gcccactgtttcgac**gac**atcaagaactggagg	160
	CBO-161 K60aE	gcccactgtttcgac**gag**atcaagaactggagg	161
	CBO-162 K60aA	gcccactgtttcgac**gcg**atcaagaactggagg	162
	CBO-163 K60aL	gcccactgtttcgac**ctc**atcaagaactggagg	163
	CBO-164 K60aY	gcccactgtttcgac**tat**atcaagaactggagg	164
	CBOLH-54 K60aI	gcccactgtttcgac**atc**atcaagaactggagg	181
	CBOLH-55 K60aV	gcccactgtttcgac**gtc**atcaagaactggagg	182
	CBOLH-56 K60aF	gcccactgtttcgac**ttc**atcaagaactggagg	183
	CBOLH-57 K60aW	gcccactgtttcgac**tgg**atcaagaactggagg	184
	CBOLH-58 K60aM	gcccactgtttcgac**atg**atcaagaactggagg	185
K199 (K60c)	K60c wild-type	tgtttcgacaaaatc**aag**aactggaggaacctg	165
	CBO-165 K60cD	tgtttcgacaaaatc**gac**aactggaggaacctg	166
	CBO-166 K60cE	tgtttcgacaaaatc**gag**aactggaggaacctg	167
	CBO-167 K60cA	tgtttcgacaaaatc**gcg**aactggaggaacctg	168
G237 (G97)	G97 wild-type	agcacgtacgtcccg**ggc**accaccaaccacgac	191
	CBOLH-64 G97W	agcacgtacgtcccg**tgg**accaccaaccacgac	192
	CBOLH-65 G97T	agcacgtacgtcccg**acg**accaccaaccacgac	193
	CBOLH-66 G97I	agcacgtacgtcccg**atc**accaccaaccacgac	194
	CBOLH-67 G97V	agcacgtacgtcccg**gtc**accaccaaccacgac	195
T239 (T99)	T99 wild-type	tacgtcccgggcacc**acc**aaccacgacatcgcg	169
	CBO-168 T99A	tacgtcccgggcacc**gcg**aaccacgacatcgcg	170
R290 (R147)	R147 wild-type	ggccagctgctggac**cgt**ggcgccacggccctg	171
	CBO-169 R147D	ggccagctgctggac**gac**ggcgccacggccctg	172
	CBO-170 R147E	ggccagctgctggac**gag**ggcgccacggccctg	173
	CBO-171 R147A	ggccagctgctggac**gcg**ggcgccacggccctg	174
K341 (K192)	K192 wild-type	agcaaggactcctgc**aag**gggggacagtggaggc	175
	CBO-172 K192R	agcaaggactcctgc**cgc**ggggacagtggaggc	176
	CBOLH-68	agcaaggactcctgc**cag**gggggacagtggaggc	196

290
289

	K192Q		
D196/ K197/ K199 (D60/ K60a /K60c)	D60/ K60a/ K60c wild-type	gtggtctccgcggcccactgtttc**gacaaa**atc**aag**aa ctggaggaacctg atcgcggtg	177
	CBO-177 D60R / K60aE / K60cE	gtggtctccgcggcccactgtttc**agggag**atc**gaaa** actggaggaacctg atcgcggtg	178
	CBO-178 D60K/ K60aE/ K60cE	gtggtctccgcggcccactgtttc**aaggag**atc**gaaaa** ctggaggaacctg atcgcggtg	179
	CBO-179 D60R / K60aM / K60cE	gtggtctccgcggcccactgtttc**aggatg**atc**gaaaa** ctggaggaacctg atcgcggtg	180
D196/ K197 (D60 /K60a)	D60 /K60a wild-type	gcggcccactgtttc**gacaaa**atcaagaactgg	197
	CBOLH-69 D60K/ K60aL	gcggcccactgtttc**aagctc**atcaagaactgg	198
	CBOLH-70 D60L/ K60aL	gcggcccactgtttc**ctcctc**atcaagaactgg	199
	CBOLH-71 D60F/ K60aL	gcggcccactgtttc**tttctc**atcaagaactgg	200
	CBOLH-72 D60M/ K60aL	gcggcccactgtttc**atgctc**atcaagaactgg	201
	CBOLH-73 D60W/ K60aL	gcggcccactgtttc**tggctc**atcaagaactgg	202
	CBOLH-74 D60F/ K60aE	gcggcccactgtttc**tttgag**atcaagaactgg	203
	CBOLH-75 D60W/ K60aE	gcggcccactgtttc**tgggag**atcaagaactgg	204
	CBOLH-76 D60V/ K60aE	gcggcccactgtttc**gtcgag**atcaagaactgg	205

C. Expresión de los **polipéptidos de FVII**

Para las expresiones iniciales del análisis hecho por ELISA y Western Blot, los polipéptidos de FVII fueron expresados en células BHK-21. Para los ensayos bioquímicos, tales como están descritos mas adelante, los polipéptidos de FVII fueron expresados en las células FreestyleTM 293-F (Invitrogen).

El polipéptido del factor VII de tipo salvaje (CB553-02, NÚMERO SEQ de ID: 3) y los polipéptidos de la variante FVII fueron expresados inicialmente en la línea celular BHK- 21 (ATCC CRL 1632) del riñón de un hámster bebé. Las células BHK-21 fueron cultivadas en un medio mínimo esencial de águila (EMEM, Invitrogen) con 10% suero fetal de ternera (FCS) en 100mm de placas de cultivo a 37°C y 5% CO_2. Después de crecer en confluencia en aproximadamente 90%, las células fueron transfectadas con 24 µg del ADN plásmido de FVII usando el estuche de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. El medio fue sustituido 6 horas después de la transfección con EMEM sin el suero que contenía 1 µ g/ml de vitamina K1 (Sigma) y las células fueron encubadas por otras 72 horas más. La expresión de FVII en el medio de cultivo celular fue ensayada por ELISA o Western Blot.

Para las análisis subsiguientes usando ensayos bioquímicos, el polipéptido del factor VII de tipo salvaje (CB553-02, NÚMERO SEQ de ID: 3) y los polipéptidos de la variante FVII fueron expresados en las células 293-F del Freestyle™ (Invitrogen). Las células fueron cultivadas en Freestyle™ 293 media (Invitrogen) en 37°C y 8% CO_2 en frascos Erlenmeyer con las tapas ventiladas. Las células fueron transfectadas usando el protocolo sugerido por el fabricante.

292

Brevemente, después del crecimiento al 1 x 10^6 células /ml, las células fueron centrifugadas y el medio fue intercambiado. Las células fueron entonces transfectadas con 240 µg del plásmido de ADN de FVII para cada 240 ml de las células que usaban 293fectin (Invitrogen). Además, 50 µl de un 1 mg/ ml de material de la vitamina K1 (Sigma) en etanol fue añadido por cada 240 ml de células. Las células crecieron por 5 días luego el sobrenadante de cultivo fue recogido. La expresión de FVII en el medio de cultivo celular fue ensayada por ELISA.

1. ELISA

Un inmuno-ensayo fue utilizado para cuantificar la cantidad de FVII humano y de FVIIa en una muestra. Los anticuerpos poli-clónales para FVII humano fueron utilizados en la capturar y detección de la proteasa en la solución. El inmuno-ensayo puede ser utilizado para determinar la concentración de proteína de un medio condicionado o de un material purificado o para determinar la concentración de FVII en otra muestra, por ejemplo, una muestra de plasma humana o de ratón. La concentración de la línea de base de FVII en la sangre humana es aproximadamente de 50 nanómetros y enzimáticamente de forma activa, FVIIa, es aproximadamente 1 nanómetro.

Para determinar la cantidad de FVII humano o la proteína de FVIIa en muestras se realizo un emparedado de ELISA. Noventa y seis placas de fondo realmente plano en poso de inmuno Maxisorp (Nunc) fueron revestidas con 100 µl/ poso de 5 ng/ µl de avidina (NeutrAvidin, Pierce Biotech.). Las placas fueron

293

292

cubiertas y incubadas con agitación por 1 hora a temperatura ambiente (TEMPERATURA AMBIENTE) luego lavandas cuatro veces en PBS con el 0.01% Tween-20 (PBST). Las placas fueron bloqueadas por un mínimo de 1 hora a TEMPERATURA AMBIENTE con agitación por la incubación de 1% con albúmina de suero bovino (BSA) (peso/volumen) en PBS añadido a cada poso en 200 µl /poso. Las placas bloqueadas fueron entonces almacenadas a 4°C hasta su uso (hasta por 2 semanas).

Antes de usarlas, las placas fueron lavadas cuatro veces en PBST para eliminar el BSA, y 100 µl/poso de un 1 ng/ µl de solución del anticuerpo biotinilado del contra-Factor VII (sistemas de R&D) fueron añadidos a cada poso y la placa fue incubada a temperatura ambiente por 45 minutos con agitación para permitir la complejación con la avidina revestida. El exceso desatado por el anticuerpo fue eliminado lavando la placa con PBST (cuatro veces).

Diluciones seriales de dos dobleces de FVII estándar (American Diagnostica; diluido en PBST), que van a partir de 50 ng/ µl a 0.8 ng/ µl, fueron añadida a la placa en 100 µl/ poso. Un poso que contenía PBST sin ningún FVII también fue incluido como control de Tampón solamente. Al ensayo de las muestras purificadas (antes y después de la activación, véase en el ejemplo 3) de FVII o de FVIIa, la muestra fue primero diluida 1: 25 en PBST, y luego continuas diluciones de 2 dobleces fueron hechas de modo que se ensayaron diluciones de 25 dobleces, 50 dobleces, 100 dobleces y 200 dobleces. Las muestras diluidas fueron añadidas a las posos en duplicado en 100 µl/ poso. A

294

~~293~~

las muestras de plasma del ensayo que contenían FVII o FVIIa, la muestra de plasma fue diluida 1: 100 y 1: 400 en PBST y añadidos a las posos en duplicado en 100 µl/ poso. Una muestra de plasma sin FVII o FVIIa también fue incluida para determinar los niveles de los antecedentes. Las placas fueron entonces incubadas por 30 minutos a TEMPERATURA AMBIENTE con agitación que permitiera cualquier FVII o FVIIa en la muestra a mezclarse con el anticuerpo del anti-FVII.

Después de la incubación con la muestra, las placas fueron lavadas 4 veces con PBST. Un anticuerpo secundario, FVII contra-humano equino (American Diagnostica), fue diluido 1: 5000 en PBST y añadidos a cada poso en un volumen de 100 µL. Las placas fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación para permitir al anticuerpo añadido unirse a los complejos de FVII o de FVII en la placa. Para eliminar el exceso del anticuerpo secundario, las placas fueron lavadas con PBST (4 veces). Para detectar el lazo del anticuerpo secundario, fue añadido a cada poso 100 µl HRP contra-equino de cabra conjugado en una dilución de 1: 5000 en PBST. Después de la incubación por 30 minutos en la temperatura ambiente con agitación, las placas fueron lavadas cuatro veces con PBST y fue añadida 100 µl/ poso de una solución que contenía un 1: 1 mezcla de sustrato TMB y de solución de peróxido de hidrógeno (Pierce Biotech). Las placas fueron agitadas para aproximadamente 1 minuto a temperatura ambiente antes de adicionarles 100µl/ poso de 2M de H_2SO_4 para parar la reacción. La densidad óptica en 450 nanómetro fue medida usando un dispositivo molecular de lector de placas

295

M5 y el valor de los antecedentes de la placa (medida solamente con PBST) que fue tomado del valor de medición de cada poso. Una curva patrón fue generada trazando la concentración del estándar FVII contra la absorbencia. Un intervalo de la curva estándar de aproximadamente 0.2 - 50 ng/ml fue generado típicamente bajo las condiciones antedichas del ELISA. La concentración de cada muestra fue entonces determinada usando la curva patrón y multiplicando por el factor de dilución, y un promedio y una desviación estándar fueron informados.

2. Western Blot

La expresión de FVII en medio de cultivo celular también fue ensayada por la Western Blot. Alícuotas que contenían la muestra no diluida, o dos diluciones seriales de 2 dobleces de PBS, del medio de cultivo celular de FVII-transfectado a las células BHK- 21 fueron marcados Conc.1 (no diluido), Conc.2 (dilución a 2 dobleces) y Conc.3 (dilución a 4 dobleces). Las muestras fueron cargadas en un lamina de gel de SDS al lado de 10, 25, y 50 nanogramo de plasma de control rFVH purificado (American Diagnostica, CB553-01). La proteína de FVII producida por las células BHK- 21 fue detectada por la Western Blot usando un anticuerpo equino policlonado primario del anti-FVII (American Diagnostica; utilizado en la concentración sugerida de fabricación) y un anticuerpo secundario anti-equino IgG conjugado con HRJP (una dilución de 1: 2000 de la solución de 1mg/ml de los laboratorios Zymed). La comparación de niveles de expresión fue hecha con el plasma del control purificado rFVII. Los resultados mostraron que las concentraciones que van de

296
295

aproximadamente 20 ng a más de 50 ng de FVII estaban presente en las alícuotas del cultivo celular.

Ejemplo 3

Purificación y activación de los polipéptidos FVII

Los polipéptidos de FVII fueron purificados usando una columna Q Sepharosa de rápido flujo (XK16), al cual los polipéptidos de FVII con funcionamiento de los dominios Gla absorberían, seguida por una etapa de elusión de los calcios. A un volumen de 240 ml del sobrenadante del cultivo de las células transfectadas de FreestyleTM 293-F fueron diluidas a 2 dobleces con una solución que contenía 20 milímetros Tris pH 8.0 y 0.01% entre 20, y luego 1.5 ml de 500 milímetros EDTA pH 8.0 fueron añadidos a la muestra diluida. Las muestras fueron filtradas antes de ser cargadas sobre una columna Q Sepharosa de rápido flujo (XK16) que había sido pre-equilibrada primero con el Tampón B (20 milímetro Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 0.01% Entre 20), luego Tampón A (20 milímetro Tris pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.01% Entre 20) en 8 ml/min. Después del ser cargado, la columna fue lavada con el Tampón A hasta que la absorbencia del flujo a través de 280 nanómetro alcanzó la línea base. El Tampón A fue sustituido con el Tampón C (20 milímetro Tris pH 8, 0.15 M NaCl, 0.01% Entre 20, 5 milímetros $CaCl_2$) y un lavado con bomba fue realizado para sustituir totalmente al Tampón en las líneas. Después de terminar el lavado con la bomba, el Tampón C fue aplicado a la columna en 8 ml/ min para eluir los polipéptidos de FVII, que fueron recogidos en 5 fracciones del ml por 60 minutos. La siguiente elusión, la columna fue lavada con el

297

296

Tampón B cuando todavía estaba recogiendo fracciones, hasta que el pigmento rosado (del medio de cultivo) fue lavado de la columna. La columna entonces fue lavada con el Tampón A para prepararlo para la purificación de FVII de la siguiente muestra.

Las fracciones eluidas fueron adicionalmente purificadas usando una columna del mono Q 5/5 (que contiene 1 ml de resina), que estaba preequilibrado inicialmente con el Tampón B, y luego con el Tampón A, en 2 ml/min. De la quinta a la octava fracción de 5m recolectadas con el Tampón C de la parte superior fueron reunidas y diluidas dos dobleces con el Tampón A, antes 1.6 ml de 500 milímetros del EDTA, pH 8.0 fue añadido. Las pequeñas alícuotas (100µl) fueron tomadas opcionalmente en este punto para el análisis, como por ejemplo por ELISA. La muestra combinada fueron cargada sobre la columna del Mono Q en 2 ml/min, luego lavados con el Tampón A. Para eluir los polipéptidos unidos de FVII, un gradiente a partir de 0% hasta 30% del Tampón B fue corrido a través de la columna durante 20 minutos, en 1 ml/min, y 0.5 ml de fracciones fueron recogidas. La columna fue entonces lavada con el Tampón B seguido por el Tampón A en preparación de la purificación de FVII de la siguiente muestra.

Los polipéptidos purificados de FVII fueron activados a FVIIa usando el factor biotinilado XA del estuche de la escisión y de la eliminación del factor XA de la proteasa de restricción (Roche). Normalmente, 7 fracciones de la purificación del Mono Q fueron reunidas en tubos cónicos de 15 ml y 388 µl de 500 milímetros de CaCl2, 38.9 µl de 10% BSA en agua destilada, y 3.2 µg del

290
297
210

factor biotinilado XA fueron añadidos. Después de la incubación por 14-16 horas a 37°C, 250 µl de avidina inmovilizada (Pierce) fueron añadidos y la muestra fue mezclada en 4°C por 30 minutos. La solución resultante fue luego filtrada a través de una columna de Econo-pak (bio Rad), y el filtrato fue mezclado con otro 250 µl de avidina inmovilizada por 30 minutos más. La solución fue filtrada otra vez y el filtrato fue concentrado a aproximadamente 300-500 µl usando un filtro centrífugo del Amicon Ultra-4 1OkDa (Millipore). La concentración de FVIIa luego fue analizada por ELISA (como se describió en el ejemplo 2.C.1) y el nivel de activación del factor VII fue controlado por Western Blot. El análisis de Western Blot fue realizado esencialmente como se describió en el ejemplo 2.C.2, pero se uso anticuerpo contra-humano de conejo del factor VIIa (Haematologic Technologies, Inc.) en 1: 2000 por 1 hora como el anticuerpo primario, seguido por HRP-Cabra Contra-Conejo IgG (H+L) (Invitrogen) en 1: 5000 por 30 minutos.

Ejemplo 4

Determinación de la constante cinética de Michaelis Menten de la actividad amidolitica de FVIIa en un sustrato de la molécula pequeña

La actividad amidolitica de las variantes de FVII fue evaluada midiendo la constante cinética de Michaelis Menten del polipéptido de FVIIa en el sustrato peptidil Espectrocima FVIIa (CH_3SO_2-D-CHA-But-Arg-pNA.AcOH). El factor tisular purificado humano Lipidado (Innovin, Dade Behring, VWR Cat # 68100-390) fue incluido en el ensayo para proporcionar una actividad óptima de FVIIa. El TF-FVIIa complejo rompe con la Espectrocima FVIIa como substrato

299
298

cromogénico altamente específico liberando una paranitroanilina- cromóforo (pNA), la cual puede ser controlada midiendo la absorción en 405 nanómetro. La actividad enzimática es determinada por el control que la absorbencia en 405 nanómetro del pNA libre generado en una función del tiempo.

Las reacciones fueron realizadas en tres diferentes concentraciones de enzima. Para la reacción, las variantes de FVIIa fueron primero diluidas a 40 nanómetro en 1 x Tampón de ensayo directo (100 milímetros Tris pH 8.4, 100 milímetros de NaCl, 5 milímetros de CaCl2, 0.01% BSA) en un tubo de 1.7 ml (tubos de microcentrífuga de baja adhesión de ISC Bioexpress). FVIIa fue diluido adicionalmente en presencia de TF (Innovin, Dade Behring) diluyendo 2 nanómetro en un depósito del polipropileno de 12 posos (Axygen) como sigue a continuación: 720 µl 5 x Tampón directo (500 milímetro Tris pH 8.4, 500 milímetros de NaCl, 25 milímetros de $CaCl_2$, 0.05% BSA), 180 µl 40 nanómetro FVIIa, y 2700 µl 2 x TF (solución madre de 6 nanómetros reconstituida en 10 ml de agua). La proteasa diluida fue incubada por 5 minutos en temperatura ambiente. El material de 2 nanómetros de FVIIa fue luego diluido en seriales de disolución de 2 dobleces para dar como resultado 1 nanómetro y 0.5 nanómetro de materiales de proteasa, respectivamente, también en presencia de TF. Las reacciones de la dilución en serie fueron como sigue a continuación: primero, 1800 µl de 2 nanómetros del material de FVIIa/TF del diluido arriba en 360 µl 5 x Tampón directo, 900 µl 2 x TF, y 540 µl agua. Este material diluido fue diluido otra vez 1:1 en 1800 µl 1 x TF en Tampón directo.

300

Una placa de la dilución del sustrato Espectrocima FVIIa (American Diagnostica) fue hecha. La solución madre de Espectrocima FVIIa fue hecha por la reconstitución de 50 µmol de vial en agua destilada a 10 milímetros y almacenada en 4 °C. Ochenta µl (10 milímetros Espectrocima FVIIa) y 60 µl + 20 µl de agua (7.5 milímetros Espectrocima FVIIa) de los 10 milímetros Espectrocima FVIIa fueron añadidos a los posos en dos columnas adyacentes de una placa de ensayo de polipropileno de 96 posos (Costar). Los dos posos fueron diluidos en seriales dos dobleces hacia abajo cada uno de los 8 posos de la columna respectiva para hacer una serie de 10x de concentraciones de sustrato que van a partir de 10 milímetros a 78 µM de sustrato establecidos para los posos de la primera columna y a partir de 7.5 milímetros a 58.6 µM sustrato establecidos para los posos de la segunda columna.

Cinco µl de cada dilución del sustrato de Espectrocima FVIIa fueron añadidos a la mitad de una placa de ensayo de 96 posos (Costar). Cuarenta cinco µl de cada uno de las tres diluciones de FVIIa/TF fueron añadidos a tres grupos de columnas de las series de diluciones de sustrato. Durante esta etapa, fue tenido cuidado para evitar introducir burbujas en los posos del ensayo. Si se introducían burbujas, eran eliminadas pinchando con una aguja limpia antes de comenzar con cada montaje. Las placas fueron mezcladas con agitación. Antes de la iniciación del ensayo, la longitud del camino de los posos del ensayo fue medida usando un espectrofotómetro lector de placas Spectramax Gemini M5 (Molecular Devices) teniendo una lectura del punto final y usando la característica del Pathcheck del programa de computadores

SoftMax (Molecular Devices). El aumento en absorbencia en 405 nanómetros fue medido cada 30 segundos para una hora en 37°C.

El programa de computador SoftMax fue utilizado para convertir la velocidad de la absorbencia (milli units/ seg) a la concentración de pNA liberada (µM/sec) usando la longitud del camino y el coeficiente de extinción del grupo saliente del pNA en 405 nanómetros, 9600 M^{-1} cm^{-1}. La ecuación de la conversión es como sigue a continuación: Velocidad x (1/60 x 1000) x (1/ 9600 x longitud del camino) x 100000. Los resultados de cada concentración de proteasa fueron representados gráficamente usando el programa de computador Graph Pad Prism con la concentración de sustrato en el X-axis y las determinadas velocidades µM/sec en el Y-axis. Usando el programa de computador Graph Pad Prism 4 Km y Ymax fueron determinados ajustando los datos a una ecuación de Michaelis Menten como sigue a continuación:

$$Y = ((k_{cat}K_m /1000000)x\ X\ x\ [E])/\ (1+ (X + K_m)$$

Donde; X es la concentración de sustrato (µM)

Y es la actividad enzimática (µM/sec)

$k_{cat}K_m$ es la constante de especificidad (M^{-1} seg^{-1})

K_m es la constante Michaelis (µM)

E es la concentración de enzima (µM)

Los valores iniciales de E=I, Km = X en 0.5 x Y max y $k_{cat}K_m$ = 1000 era en conjunto.

La actividad específica (munits/min/nM) de cada uno de las variantes de FVIIa, tipo salvaje FVIIa (CB553-02) fue determinada con el ensayo descrito

302

301

anteriormente usando 420 µM Espectrocima FVIIa (tabla 11). La actividad de las variantes de FVIIa era normalmente mayor que la del tipo salvaje FVIIa (medido en 2.7 munits/min/nM). La actividad de las variantes de FVII fue comparada con la de las variantes descritas en la bibliografía (CB591- CB594), y en la mayoría de las variantes de FVII se encontró que tenían actividad comparable a o mayor que la actividad de las variantes que habían sido previamente descritas en la bibliografía.

Tabla 11. Actividad específica de las variantes de FVIIa

ID	No SEQ ID	Mutación (Numeración de FVII maduro)	Mutación (Numeración quimotripsina)	Actividad especifica (munits/min/nM)
CB553-02	3	ninguno	ninguno	2.7
CB554	18	D196K	D60K	1.7
CB555	19	D196R	D60R	1.9
CB556	20	D196A	D60A	3.2
CB557	24	K197D	K60aD	4.4
CB558	23	K197E	K60aE	4.4
CB559	22	K197A	K60aA	4.6
CB560	25	K197L	K60aL	1.1
CB561	21	K197Y	K60aY	5.2
CB562	28	K199D	K60cD	5.5
CB563	23	K199E	K60cE	5.2
CB564	27	K199A	K60cA	3.8
CB565	30	T239A	T99A	2.0
CB566	33	R290D	R147D	5.5
CB567	32	R290E	R147E	2.9
CB568	31	R290A	R147A	3.9

303
302

CB569	35	K341R	K192R	2.9
CB579	36	D196R/R290E	D60R/R147E	2.9
CB580	37	D196K/R290E	D60K/R147E	2.7
CB581	38	D196R/R290D	D60R/R147D	3.1
CB586	39	D196R/ K197E/ K199E	D60R/K60aE/ K60cE	5.2
CB587	40	D196K/ K197E/ K199E	D60K/K60aE/ K60cE	4.8
CB588	41	D196R/ K197E/ K199E/R290E	D60R/K60aE/ K60cE/R147E	4.9
CB589	42	D196R/ K197M/ K199E	D60R/K60aM/ K60cE	5.4
CB590	43	D196R/ K197M/ K199E/R290E	D60R/K60aM/ K60cE/R147E	6.2
CB591	147	L305V/S314E/ L337A/F374Y	L163V/S170bE/ K188A/F225Y	3.9
CB592	148	M298Q	M156Q	3.6
CB593	149	V158D/E296V/ M298Q	V21D/E154V/ M156Q	3.9
CB594	150	V158D/E296V/ M298Q/K337A	V21D/E154V/ M156Q/K188A	5.0

Ejemplo 5

Determinación de la actividad catalítica de FVIIa para su sustrato, factor X

La actividad catalítica de las variantes de FVIIa para sus sustratos, Factor X (FX), fue evaluada indirectamente en un ensayo fluoro génico probando la actividad de FXa, generada sobre la activación de FVIIa, en el sustrato sintético Spectrafluor FXa. Una forma lapidada del factor tisular purificado (TF) fue incluida en el ensayo para proporcionar una actividad óptima de FVIIa. La actividad enzimática de FXa para Spectrafluor FXa (CH3SO2-D-CHA-Gly-Arg-AMC.AcOH) fue determinada midiendo el aumento en la absorbencia del fluoró foro libre generado, AMC (7-amino-4-methilcoumarino), en función de tiempo.

304

303

Brevemente, las variantes de FVIIa fueron diluidas inicialmente a 0.5 µM en 1x en un tampón de ensayo directos (100 mM Tris pH 8.4, 100 milímetros de NaCl, 5 milímetros CaC12, y 0.01% BSA), luego diluido nuevamente a 0.1 nanómetros dentro de un tampón de ensayo directo. Lipidado integral TF (Innovin; Dade Behring) fue reconstituido en 20 ml de agua para hacer una solución de 3 nanómetros y diluido en 0.2 nM dentro de 1 x tampón de ensayo directo. Cuatrocientos µl de 0.1 nanómetros FVIIa fueron mezclados con 400 µl 0.2 nanómetro TF e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. La solución fue nuevamente diluida por dos, la diluciones en 2 dobleces en 1x tampón de ensayo directo que contenía 0.2 nanómetros TF para obtener un total de tres diluciones de FVIIa de 0.05 nanómetros, 0.025 nanómetros, o 0.0125 nanómetros de FVIIa cada uno contenían 0.2 nanómetros TF (soluciones de FVIIa/TF).

El sustrato, Factor X (FX; American Diagnostica; 80 µg) fueron reconstituidos en 135.6 µl de agua destilada para dar un material de 10 µM y almacenado en alícuotas a -80 °C. Las alícuotas no fueron congeladas y descongeladas más de una vez. El material de FX fue diluido a 800 nanómetro en el tampón de ensayo directo, luego diluido en seriales de dos dobleces para obtener soluciones de FX que van a partir del 800 nanómetro a 50 nanómetro.

Spectrofluor XA (American Diagnostica; 10 µmoles) fueron reconstituidos en agua destilada a 5 milímetros y almacenados a 4 °C. Una placa de ensayo con la mitad del área en negro con 96 posos (Costar), 5 µl Spectrofluor XA (American Diagnostica) fueron añadidos a cada poso. Luego, 25 µl de la

304

solución de FX fueron añadidos a cada poso. A la última fila de posos de la placa, un control negativo en el cual no fue añadido FX también fue incluido en el ensayo. Dos veces, las tres concentraciones de las soluciones de TF/FVIIa fueron añadidas en 20 µl a los posos de las columnas respectivas de la placa de modo que cada dilución de TF/FVIIa fuera ensayada contra cada dilución de FX, con un conjunto de las columnas que no contenían TF/FVIIa (es decir. FX solo). Las placas fueron mezcladas por agitación. La fluorescencia fue medida con base en el tiempo con un conjunto de espectrafluorometros para leer cada 30 segundos por 1 hora en 37ºC (ex: 380 nanómetro, EM: 450 nanómetro, corte: 435 nanómetro), y el tiempo fue informados en unidades cuadradas de tiempo. Siguiendo con el ensayo, una curva patrón de fluorescencia AMC en el mismo lector de placas fue generada para convertirla a unidades de fluorescencia al sustrato uM liberado en el ensayo. 1 milímetro AMC en DMSO (Invitrogen) fue diluido a 0.02 milímetros en 1 x tampón de ensayo directo. Seis, las diluciones seriales de dos dobleces de AMC fueron hechos para que vayan a partir del 20 nanómetro a 0.625 nanómetros en 1 x tampón de ensayo directo. La fluorescencia de AMC fue medida usando las mismas condiciones de ensayo como se describe anteriormente y un gráfico de la fluorescencia contra la concentración de AMC fue trazado. La pendiente de la línea fue calculada, la cual sirvió como el factor de conversión para RFU µM en cálculos subsiguientes.

Las constantes de la cinética para la activación de FVIIa de FX fueron calculadas realizando un análisis de la regresión lineal en el inverso de la

306

305

concentración de sustrato contra el inverso de la velocidad de la división del sustrato (en unidades de segundos^2), con $V_{max,FVI[a}$ calculado como el inverso de la interceptación de la y, $K_{m,FVI[a}$ como la pendiente en la interceptación de la y, V_{max} / $K_{m,FVI[a}$ como el inverso de la pendiente. El valor de k_{cat} fue entonces derivado usando la ecuación;

k_{cat} / $K_{m,FVI[a}$ = V_{max} / $K_{m,FVI[a}$ x 1 (0.5 x k2 x [FVIIa en μM] x el factor de conversión (RFU/ μM))

donde; k2 = ([S] x $k_{cat,Fxa}$)/($K_{m,Fxa}$+ [S]), donde $k_{cat,Fxa}$ y)/($K_{m,Fxa}$ son las constantes para la división de FXa de SpectrofluorXa determinaron experimentalmente usando las normas estándar de FXa como $k_{cat,Fxa}$ = 117 seg^{-1}, y $K_{m,Fxa}$ = 164 μM.

Usando las condiciones de ensayo antedichas, la constante cinética k2 fue determinada para ser 88.1 el seg^{-1}.

El K_m y el k_{cat} para cada uno de las variantes de FVIIa fueron determinados para evaluar la actividad catalítica, k_{cat} / K_m ($M^{-1}seg^{-1}$) de cada uno de sus sustratos, FX (tabla 12). La proteasa de tipo salvaje de FVIIa (CB553-02) también fue evaluada y se encontró que mostraba una actividad de 1.8 x 10^7 $M^{-1}seg^{-1}$. Activación del factor VIIA del Factor X, según lo medido por Krishnaswamy, y otros. (J. Biol. Quím. (1998) 273:8 4378-86) son 2.9 x 10^7 $M^{-1}seg^{-1}$. Muchas de las variantes mostraron actividad comparable con la de la proteasa sin modificar. En algunas instancias, las variantes de FVIIa exhibieron una actividad catalítica mejorada comparada con la de la proteasa sin

302

806

modificar. Por ejemplo, CB558, CB561 y CB563 exhibieron actividades catalíticas de 5.2×10^7, 4.3×10^7 y 5.9×10^7 M^1seg^1.

Tabla 12. Actividad catalítica de las variantes de FVIIa

ID	Mutación (Numeración de FVII maduro)	Mutación (Numeración quimotripsina)	Actividad catalítica k_{cat} / K_m ($M^{-1}seg^{-1}$)	Log_{10} (k_{cat} / K_m)	K_m (mM)	k_{cat} (seg-1)
CB553-02	ninguno	ninguno	1.8×10^7	7.3	0.039	0.71
CB554	D196K	D60K	3.1×10^7	7.5	0.038	1.2
CB555	D196R	D60R	2.6×10^7	7.4	0.036	0.95
CB556	D196A	D60A	2.6×10^7	7.4	0.292	7.4
CB557	K197D	K60aD	2.5×10^7	7.4	0.046	1.2
CB558	K197E	K60aE	5.2×10^7	7.7	0.020	1.1
CB559	K197A	K60aA	3.6×10^7	7.6	0.026	0.94
CB560	K197L	K60aL	9.3×10^5	6.0	0.641	0.60
CB561	K197Y	K60aY	4.3×10^7	7.6	0.041	1.8
CB562	K199D	K60cD	1.4×10^7	7.2	0.070	1.0
CB563	K199E	K60cE	5.9×10^7	7.8	0.041	2.4
CB564	K199A	K60cA	8.4×10^6	6.9	0.103	0.87
CB565	T239A	T99A	6.1×10^5	5.8	0.128	0.078
CB566	R290D	R147D	1.2×10^6	6.1	0.045	0.053
CB567	R290E	R147E	6.8×10^4	4.8	1.9	0.014
CB568	R290A	R147A	4.1×10^6	6.6	0.018	0.074
CB569	K341R	K192R	2.7×10^6	6.4	0.092	0.25
CB579	D196R/R290E	D60R/R147E	1.4×10^6	6.1	0.032	0.044
CB580	D196K/R290E	D60K/R147E	1.9×10^6	6.3	0.025	0.047
CB581	D196R/R290D	D60R/R147D	3.0×10^6	6.5	0.28	0.085
CB586	D196R/ K197E/ K199E	D60R/K60aE/ K60cE	7.8×10^6	6.9	0.033	0.26

CB587	D196K/ K197E/ K199E	D60K/K60aE/ K60cE	3.7×10^6	6.6	0.062	0.26
CB588	D196R/ K197E/ K199E/R290E	D60R/K60aE/ K60cE/R147E	5.3×10^4	4.7	0.888	0.047
CB589	D196R/ K197M/ K199E	D60R/K60aM/ K60cE	1.1×10^7	7.0	0.049	0.54
CB590	D196R/ K197M/ K199E/R290E	D60R/K60aM/ K60cE/R147E	4.6×10^5 ††	5.7	0.030	0.014
CB591	L305V/S314E/ L337A/F374Y	L163V/S170b E/K188A/F225 Y	6.3×10^6	6.8	0.235	1.5
CB592	M298Q	M156Q	3.1×10^7	7.5	0.085	2.7
CB593	V158D/E296V / M298Q	V21D/E154V/ M156Q	4.9×10^7	7.7	0.063	3.1
CB594	V158D/E296V / M298Q/K337A	V21D/E154V/ M156Q/K188A	1.2×10^8	8.1	0.035	4.1

††Valores aproximados.

Ejemplo 6.

Determinación de la concentración de proteasa viable catalíticamente en una solución

La concentración de proteasa FVIIa viable catalíticamente en una solución madre fue determinada valorando un complejo del factor VIIa y del factor tisular soluble (sTF) con un inhibidor irreversible de péptido FVIIa, Phe-Phe-Arg-Clorometilquetona (FFR- CMK). El inhibidor adhiere a FVIIa pero no a FVII. La incubación extendida en una alta concentración de FVIIa (50 nanómetro) asegura la valoración completa de la proteasa. La actividad residual del complejo de FVIIa/TF después de incubación con FFR-CMK fue

medida para determinar la concentración de FVIIa viable catalíticamente en la solución madre original.

A. Formato de placa de ensayo de 96 pozos

Una placa de ensayo de media área transparente de 96 posos (Nunc) fue pre tratada añadiendo 150 µl/ poso de 1 x tampón de la placa (100 milímetros Tris pH 8.4, 100 milímetros de NaCl, 0.01% BSA, 0.01% Tween-20) a cada poso e incubada la placa en 37°C por un mínimo de 1 hora. El tampón fue eliminado totalmente secándolo en una toalla de papel y centrifugando la placa boca abajo para eliminar cualquier tampón restante, y la placa fue secada al aire por 1 hora y almacenado cubierto a temperatura ambiente (TEMPERATURA AMBIENTE).

Para preparar la mezcla de reacción FVIIa/sTF/FFR-CMK, un material de FVIIa (American Diagnostica; diluido a 5 µM en 50% de glicerol (v/v) y almacenado en frío en alícuotas en -20 °C) o una variante de FVIIa fue la primera diluida en 500 nanómetro en 1 x tampón de ensayo directo de x (100 milímetros Tris pH 8.4, 100 milímetros de NaCl, 5 milímetros de $CaCl_2$, 0.01% BSA). La mezcla de FVIIa/sTF fue hecha entonces mezclando 90 µl de agua destilada con 36 µl 5 x tampón de ensayo directo, 18 µl 500 nanómetro FVIIa, y 18 µl 5 µM sTF de M (Factor humano de coagulación recombinante III/ factor tisular soluble; Sistemas del R&D; la solución madre utilizada fue 19.6 µM en 50% de glicerol y fue diluida a 5 µM en 1 x tampón de ensayo directo y almacenada hasta dos semanas en 4°C). luego se les permitió ser complejos por 5 minutos a temperatura ambiente.

Una solución madre de 10 milímetros FFR-CMK (Bachem) en DMSO (almacenada a -20 °C) fue diluida en agua a 3.5 µM. Usando una fila de una placa opaca de almacenamiento de polipropileno (Costar #3363), las diluciones en serie de dos dobleces en agua de FFR-CMK fueron hechas a través de 11 posos de una placa opaca de 96 posos, con la ultima fila de posos que contenía solamente agua como control. Éste es la solución de serie de inhibidores 10x FFR-CMK. En cada poso de la placa de ensayo de media área clara pre tratada de 96 posos, 10.8 µl de la mezcla de FVIIa/sTF fueron añadidos, seguido por 1.2 µl de la serie del inhibidor de 10x FFR-CMK. Las soluciones fueron mezcladas bien y la placa fue centrifugada a <3000 rpm por 5 minutos para eliminar las gotas en los posos. La placa fue cubierta e incubada por 8 horas en 37°C.

Para ensayar la actividad residual del complejo FVIIa/TF, una mezcla del sustrato Espectrozima FVIIa (American Diagnostica, #217L; material reconstituido de vial µmol 50 en 5 a 10 milímetros de agua destilada y almacenado en 4°C) y 5X de tampón directo (500 milímetros Tris pH 8.4, 500 milímetros de NaCl, 25 milímetros de $CaCl_2$ y 0.05% BSA) fue primero preparado al mezclar 360 µl 5 x tampón de ensayo directo de 180 µl de una solución de 10 milímetros de Espectrocima FVIIa y 1080 µl de agua. A cada poso de la placa de ensayo, se le añadió 108 µl de la solución de sustrato preparada. Los posos fueron mezclados y la placa fue incubada en 37°C. El aumento en absorbencia en 405 nm fue medido cada 30 segundos para una

hora a 37°C con un lector de placas Spectramax Géminis M5 de Molecular Divices.

Usando el programa de computador SoftMax (Molecular Devices), las velocidades de absorbencia fueron medidas y la actividad fraccionada de las proteasas incubadas con un inhibidor fueron determinadas dividiendo la velocidad promedio por la velocidad desinhibida de la proteasa. La actividad fraccionada fue representada gráficamente contra la concentración de FFR-CMK, y los puntos que eran > 90% o <10% de la actividad desinhibida fueron descartados. Una línea fue entonces dibujada a través de los puntos restantes para determinar la interceptación de X, que representa la concentración de la proteasa activa en la solución. Los valores de múltiples ensayos fueron medidos y promediado y la desviación estándar fue determinada.

B. Formato de ensayo de 384 pozos

Con el objetivo de aumentar la precisión y la producción de la valoración, el ensayo previo fue modificado por un formato basado de placas de 384 posos. La incubación fue realizada por siete horas en una concentración alta de proteasa (250 nanómetros) con una serie de concentraciones de FFR-CMK que atravesaban el intervalo a partir del 400 nanómetro a 53 nanómetros. La actividad residual fue medida añadiendo sustrato de FVIIa (Mesil-dFPR-ACUMULADOR) y midiendo el cambio en señal de fluorescencia en el tiempo.

Rápidamente, una placa de ensayo negra de 384 posos (Nunc) fue pre tratada como en el ejemplo 6. Luego, una solución de FVIIa/sTF fue preparada al mezclar 32.5 µl 1 µM FVIIa + 19.5 µl 5 µM sTF + 6.5 µl 5X tampón de AST

312

311

(100 milímetros Na Hepes, pH 7.5, 750 milímetros de NaCl, 25 milímetros de CaCl2, 0.5% BSA, 0.5% PEG 8000) y 6.5 µl dH20. Esta reacción fue incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. La mitad de una placa de 384 posos acomoda 5 proteasas medidas en triplicado, y una sola muestra de control del ensayo. Durante la incubación de FVIIa/sTF, los 20 milímetros de FFR-CMK fueron diluidos a 8 µM en 1 milímetro HCl, seguido por 9 series de diluciones de 1.25 dobleces a través de una placa de 96 posos. Los dos posos restantes de la fila fueron dejados con 1 milímetro HCl solamente. Esta fila luego fue diluida en 10 dobleces en 1X de tampón de AST y mezclado para generar una serie de concentraciones de FFR-CMK a partir del 800 nanómetro a 107 nanómetros. A cada fila de la placa de 384 posos, le fueron medidos 4 µl de la serie de la dilución de FFR-CMK con una pipeta. luego, 4 µl de la solución de FVIIa/sTF fueron mezclados con la serie del inhibidor a través de once columnas de la placa. La columna final fue llenada con 4 µl del tampón de 1X AST para que actuara como la pieza elemental de la placa. La placa fue centrifugada, sellada, e incubada a temperatura ambiente por siete horas con agitación. El ensayo fue iniciado con 72 µl de 110 µM de Mesyl-dFPR-ACC diluido en 1X de tampón de AST. El aumento en fluorescencia fue controlado en Ex: 380 nanómetro y Em: 460nm por 20 minutos con lecturas cada 45 segundos en 37°C. Los datos fueron analizados de manera semejante como en el ejemplo 6, con los siguientes refinamientos. Primero, la actividad residual fue limitada a esas actividades entre el 20% y el 80% de las actividades solamente de la proteasa. En segundo lugar, la intercepción de Y del ajuste linear fue

precisada para caer entre 0.9 y 1.1. Tercero, la intercepción de X fue precisada a estar entre 125 nanómetro y 375 nanómetro. La intercepción de X para las tres réplicas de cada proteasa fue promediada y el valor y la desviación estándar informados.

Ejemplo 7

La determinación del IC50 para la inhibición de TFPI de FVIIa/TF

La potencia de la interacción entre TFPI y el complejo de FVIIa/TF fue evaluada midiendo el nivel de inhibición de diferentes concentraciones de TFPI en la actividad catalítica de FVIIa/TF hacia un sustrato, Espectracima VIIa. La concentración de TFPI que fue requerido para la inhibición del 50% (IC50) fue calculada para cada variante de FVII, y una norma de FVIIa.

Una placa de ensayo de media área color clara de 96 posos (Nunc) fue pre tratada añadiéndole 150 µl/ poso de 1 x tampón de placa (100 milímetros Tris pH 8.4, 100 milímetros de NaCl, 0.01% BSA, 0.01% Tween-20) a cada poso e incubando la placa en 37ºC por un mínimo de 1 hora. El tampón fue eliminado totalmente agitando y secando la placa y centrifugando la placa boca abajo para eliminar el tampón restante. La placa fue secada al aire para 1 hora, y almacenada a temperatura ambiente (TEMPERATURA AMBIENTE).

En un tubo de la microcentrífuga del 1.7 ml (tubo de microcentrífuga de baja adhesión de ISC Bioexpress), una mezcla de FVIIa/TF fue preparada en un volumen total de 450 µl mezclando 9 µl de 250 nanómetro de FVIIa (American Diagnostica, CB553-02 o una respectiva variante para ser ensayada) fue mezclado con 337.5 µl de 2 x TF (Innovin; Dade Behring; el

314
313

producto liofilizado resuspendido en 10 mL de agua destilada para generar 2X TF, del cual iguala aproximadamente 7 nanómetro de TF lipidado), 90 µl 5 x tampón de ensayo (500 milímetros Tris pH 8.4, 500 milímetros de NaCl, 25 milímetros de $CaCl_2$, 0.05% BSA) y 13.5 µl de agua, dando por resultado una solución que contiene 5 nanómetro FVIIa y 5.2 nanómetro TF. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir los componentes complejarse. A cada poso de 2 columnas en la placa de ensayo de media área de color claro pre tratada de 96 posos, 25 µl de la mezcla respectiva de FVIIa/sTF fueron añadidos y la placa fue cubierta para evitar la evaporación.

TFPI recombinante humano (R&D Systems) fue disuelto inicialmente en 33 µl de 50% glicerol (v/v) para hacer un material de 10 µM para almacenarse a -2O°C. El material de TFPI fue diluido adicionalmente a 1.5 µM en un final 1 x tampón directo (100 milímetros Tris pH 8.4, 100 milímetros de NaCl, 5 milímetros de $CaCl_2$, 0.01% BSA) en una placa de almacenamiento de polipropileno como sigue a continuación: para cada proteasa ensayada, 87.5 µl de una solución de 1.5 µM de TFPI fueron hechos mezclando 13.1 µl 10 µM TFPI con 17.5 µl 5 x tampón de ensayo y 56.9 µl de agua destilada. Las diluciones seriales de tres dobleces de la solución de TFPI fueron hechas en 1 x tampón de ensayo mezclando 27.5 µl TFPI en 55 µl 1x tampón de ensayo, tal que las soluciones que contenían 750 nanómetro, 250 nanómetro, 83.3 nanómetro, 27.8 nanómetro, 9.26 nanómetro, 3.1 nanómetro, y 1.03 nanómetro TFPI fueron generadas. El poso final de la serie contuvo solamente 1X tampón directo como control.

Veinticinco µl de cada dilución de TFPI fueron añadidos a 2 posos (es decir. dos veces) de 2 columnas de una placa de ensayo de media área color clara de 96 posos que contenía la mezcla de FVIIa/TF, tal que la mezcla de la proteasa era ensayada dos veces con cada dilución de TFPI. Una solución de 1 x tampón de ensayo de sin TFPI también fue añadida a 2 posos que contenían la mezcla de FVIIa/TF como control negativo. La placa fue agitada brevemente y luego centrifugada en 3000 rpm por 5 minutos antes de la incubación en 37°C por 1.5 horas.

Una solución madre de Espectracima VIIa (American Diagnostica) fue preparada reconstituyendo 50 µmoles de 5 a 10 milímetros de agua destilada y almacenada a 4°C hasta su uso. Inmediatamente antes de uso, la solución fue diluida a 600 µM en agua destilada. Siguiendo la incubación de la placa de ensayo de arriba, 10 µl del Espectracima VIIa diluido fue añadido a cada poso de la placa de ensayo. Las reacciones fueron mezcladas y la placa fue incubada a 37°C. El aumento de la absorción a 405 nanómetro fue medido cada 30 segundos por una hora a 37C°, y la tasa de absorción fue calculada usando el programa de computador SoftMax Pro (dispositivos moleculares).

Para determinar el grado de inhibición por TFPI, las tasas de absorción de la reacción de la proteasa que contenían TFPI, fueron divididas primero por la reacción de la tasa de absorbencia de las que no contenía TFPI (la muestra de control) para obtener la actividad de fraccionamiento, y el $\log_{10}$ de cada concentración de TFPI pudo ser determinado. Usando el programa de computador GraphPad Prism, el $\log_{10}$ [TFPI] fue trazado vs. La actividad de

fraccionamiento para cada proteasa, y la curva de respuesta a la dosis fue generada con un ajuste a la curva, asumiendo que la parte superior y la inferior de la actividad de los datos son fijos entre 1 y 0, respectivamente. El programa fue utilizado para determinar la inhibición de TFPI, tanto en los valores de IC_{50} (pIC_{50}), y del valor absoluto de IC_{50} (La inhibición del TFPI en el nanómetro) para cada proteasa, y su promedio y la derivación estándar fueron determinados.

El nivel de inhibición de TFPI en cada una de las variantes de FVIIa en complejo con el sTF fue determinado y expresado como IC_{50} o PIC_{50} (tabla 13). El grado al cual TFPI inhibió la actividad de no modificación del FVIIa (CB553-02) en complejo con el sTF también fue determinado, y se encontró el IC_{50} como 88 nanómetro. Nueve de las variantes de FVIIa que fueron generadas mostraron una disminución en su potencia de interacción con TFPI, según lo reflejado en los valores crecientes de IC50.

Tabla 13. Inhibición de las variantes de FVIIa por TFP

ID	Mutación (Numeración de FVII maduro)	Mutación (Numeración de quimotripsina)	IC_{50} (nM)	pIC_{50}
CB553-02	ninguno	ninguno	88	7.1
CB554	D196K	D60K	45	7.4
CB555	D196R	D60R	37	7.4
CB556	D196A	D60A	5	8.3
CB557	K197D	K60aD	220	6.7
CB558	K197E	K60aE	310	6.5
CB559	K197A	K60aA	53	7.3
CB560	K197L	K60aL	1100	5.9

317

316

CB561	K197Y	K60aY	110	7.0
CB562	K199D	K60cD	63	7.2
CB563	K199E	K60cE	33	7.5
CB564	K199A	K60cA	68	7.2
CB565	T239A	T99A	320	6.5
CB566	R290D	R147D	240	6.6
CB567	R290E	R147E	440	6.4
CB568	R290A	R147A	200	6.7
CB569	K341R	K192R	300	6.5
CB579	D196R/R290E	D60R/R147E	28	7.6
CB580	D196K/R290E	D60K/R147E	52	7.3
CB581	D196R/R290D	D60R/R147D	32	7.5
CB586	D196R/ K197E/ K199E	D60R/K60aE/ K60cE	13	7.9
CB587	D196K/ K197E/ K199E	D60K/K60aE/ K60cE	20	7.7
CB588	D196R/ K197E/ K199E/R290E	D60R/K60aE/ K60cE/R147E	28	7.6
CB589	D196R/ K197M/ K199E	D60R/K60aM/ K60cE	44	7.4
CB590	D196R/ K197M/ K199E/R290E	D60R/K60aM/ K60cE/R147E	66	7.2
CB591	L305V/S314E/ L337A/F374Y	L163V/S170bE/ K188A/F225Y	43	7.4
CB592	M298Q	M156Q	35	7.5
CB593	V158D/E296V/ M298Q	V21D/E154V/ M156Q	41	7.4
CB594	V158D/E296V/ M298Q/K337A	V21D/E154V/ M156Q/K188A	22	7.7

Ejemplo 8

Evaluación en vivo de la actividad coagulante de FVIIa de tipo salvaje

Para realizar el ensayo se tomo un ratón con hemofilia A, el cual fue establecido para evaluar la actividad coagulante de los polipéptidos de FVIIa. La hemofilia A fue inducida en ratones CD-I por medio de la administración de

310

317

los anticuerpos del anti-FVIII, seguida por la extracción quirúrgica de las puntas de sus colas para iniciar la hemorragia. Los ratones entonces fueron tratados con el polipéptido de FVIIa, y el tiempo necesario para que estos dejaran de sangrar y la cantidad de sangre perdida durante este tiempo, fue medida para determinar la actividad coagulante de los polipéptidos de FVIIa.

Los ratones machos CD-I fueron anestesiados vía intraperitoneal con sodio thiobarbital en 100 mg/kg, y con cetamina en 100 mg/kg. La lidocaína fue administrada por inyección subcutánea en el cuello ventral para reducir la sensibilidad. La tráquea y la arteria carótida fueron canuladas a través de una pequeña incisión en la piel del cuello para facilitar libremente la respiración y la administración de los anticuerpos del anti-factor VIII, con el factor humano recombinante VIIa (rhFVIIa) y/o de los polipéptidos modificados de FVII.

Los ratones fueron canulados con anticuerpos de oveja-anti-humano-FVIII en dosis de 3.76 mg (afinidad Biológica, lote IG129R4, 612 ratón BU/ml) en 40 µL. Esta dosis fue determinada conduciendo un experimento de la respuesta de la dosis inicial con el anticuerpo, usando 0.376, 0.94, 1.88 y 3.76 mg del contra-humano-FVIII, y de evaluar el tiempo de la pérdida de sangre y de la cantidad de la hemorragia. Después de 20 minutos, las colas de los ratones eran colocadas en los tubos de 15mL que contenían 39°C de Solución salina taponada fosfato (PBS) por un período de 10 minutos. A los 30 minutos, las colas fueron extraídas rápidamente de la solución de PBS y los últimos 5 milímetros de las colas fueron cortados para iniciar la hemorragia. El tiempo en el cual la hemorragia comenzó fue señalado. Las colas fueron entonces

devueltas al tubo que contenía los 39°C de PBS y se les permitió sangrar por 5 minutos (PRE-sangrado) para asegurar que los ratones hubieran respondido al contra del anticuerpo de FVIII. Después del PRE sangrado, a los ratones se les administro polipéptidos de FVIIa o el vehículo en los cuales las proteínas de FVIIa fueron preparadas y suministradas. Los polipéptidos de FVIIa fueron diluidos en PBS o en un Tampón compuesto de cloruro sódico de 52 milímetros, 10.2 milímetros de cloruro cálcico deshidratado, 9.84 milímetros de glicilglicina, 0.01% de polisorbato 80 y 165 milímetros de manitol. Las preparaciones de FVIIa fueron administradas en 1, 3 o 10 mg/kg, en un volumen equivalente a 3 mL/kg, vía la cánula en la carótida y las colas fueron colocadas en tubos nuevos que contenían 39°C de PBS. La hemorragia fue monitoreada por un período de 20 minutos y los tiempos en los cuales la hemorragia se detenía eran anotados. El tiempo total de la hemorragia fue calculado como la suma de la duración de la hemorragia durante el PRE sangrado, y la duración del sangrado después de la administración de los polipéptidos de FVIIa, o PBS o el Tampón.

Para determinar la cantidad de sangre perdida durante los episodios de la hemorragia, se analizo el contenido de hemoglobina en los tubos de 15mL. El Triton X-100 fue diluido en proporción 1 en 4 en agua esterilizada y 100 µL fueron añadidos a 1mL de las muestras para causar hemólisis. La absorción de las muestras entonces fue medida en una longitud de onda de 546 nanómetros. Para calcular la cantidad de sangre perdida, la absorción fue leída vs. a una curva estándar generada midiendo la absorción en 546 nanometros de

320

319

volúmenes conocidos de sangre múrino, diluidos en PBS y emulsionada como se hizo en la parte superior con Triton X 100.

Un experimento fue llevado a cabo para comparaba el rhFVIIa (CB533) generado como se describe anteriormente con el FVIIa humano recombinante disponible en el comercio (NovoSeven®, Novo Nordisk) y la pérdida de sangre fue evaluada con la continua administración de una dosis de 3 mg/kg de cada proteína. La pérdida de sangre en el grupo del vehículo (Tampón, n = 15) fue 671.9 + - 57.89 µl en un período de 20 minutos. Esto fue reducida por el rhFVIIa producido por Catalyst Biosciences a 264.1 + - 56.59 µl y por NovoSeven (R) a 273.7 + - 53.93 µl (n = 14). Este experimento demostró equivalencia entre las dos proteínas.

Ejemplo 9

Análisis Farmacocinético de los polipéptidos de FVIIa

Las propiedades farmacocinéticas de los polipéptidos de FVIIa fueron evaluadas por la medición de la cantidad del factor humano VIIa en el plasma del ratón. Dos ensayos fueron usados para cuantificar el FVIIa en el plasma. Un ELISA fue utilizado para cuantificar la proteína total del FVIIa en el plasma y un ensayo de coagulación FVIIa-dependiente (FVII: C) fue empleado para cuantificar la actividad del coagulante de los polipéptidos de FVIIa en el plasma.

A. Administración de los polipéptidos de FVIIa a los ratones

Los polipéptidos de FVIIa modificados y la proteína sin modificar del recombinante FVIIa humano (rhFVIIa) (NovoSeven®, Novo Nordisk) fue

321

320

evaluada en estudios farmacocinéticos. Para cada estudio, 18 ratones machos CD-I fueron inyectados con una dosis bolo intravenosa (0.1-3.0 mg/kg, dependiendo del estudio) del rFVIIa. En 5, 15, 30, 60, 120, y 240 minutos después de la inyección, tres ratones de cada protocolo de inyección se les hizo la eutanasia por medio de asfixia con CO2 y aproximadamente 1.0 ml de sangre fueron vertidos en una jeringa de 1.0 ml por medio de una punción cardiaca percutánea. Cada jeringa fue cargada con suficiente citrato de sodio para lograr una concentración final de 3.2% en 1 mL de sangre. Las muestras de sangre fueron entonces centrifugadas en 9000 rpm por 8 minutos en 4°C. El plasma fue trasladado a tubos de 1.5 ml para ser marcados individualmente (Eppendorf), congelados instantáneamente en nitrógeno líquido y almacenado en -80°C. Además, un ratón por cada experimento fue inyectado con el vehículo solo (el ficticio) y el plasma de este ratón fue utilizado para el historial de la determinación de la actividad de FVIIa.

B. Ensayo ELISA

Un estuche disponible en el comercio, IMUBIND® del factor VII ELISA (American Diagnostica) fue utilizado para detectar la proteína de FVII en el suero de ELISA. Este estuche emplea una placa precubierta con un anticuerpo de anti-FVII/FVIIa para capturar la proteína, y un anticuerpo biotinilado de anti-FVII para la detección a través de una esteptavidina marcada como peroxidasa de rábano picante. El estuche era utilizado según la dirección de los fabricantes con las siguientes excepciones: primero, la curva estándar ha sido reducida para asegurar un rango lineal sobre el intervalo total de concentración y se

322
321

extiende a las concentraciones de 0.88 ng/ml a 10 ng/ml; en segundo lugar, la variante FVIIa purificada en sí misma fue utilizada para la curva patrón en vez de La FVII estándar proporcionadas con el estuche debido a las diferencias en la afinidad de los anticuerpo. Experimentos indicaron que el complejo de FVIIa con anti-trombina III (ATIII), un inhibidor potencial del plasma de FVIIa, se detecto al 75% del nivel de la proteasa libre, asegurando que el envase del ensayo detecta el total de FVIIa en la muestra de plasma tanto en forma activa como inactiva.

Brevemente, las muestras de plasma fueron descongeladas a temperatura ambiente y diluidas 10 dobleces en Tampón de muestra (PBS + 0.1% Triton X-100 + 1.0% BSA) luego diluidas en serie por 5.5 dobleces para cuatro diluciones. Las cuatro muestras diluidas fueron diluidas 2 dobleces sobre la placa de ELISA para las diluciones finales de la muestra de 20, 110, 605 y 3327.5 dobleces. Estas cuatro diluciones del plasma de ratón cubrieron un intervalo de concentraciones de la proteasa desde 33.000 ng/ml a 20 ng/ml. Cada muestra fue medida en dos placas independientes de ensayos, y esas mediciones dentro del intervalo de la curva patrón fueron utilizadas para calcular la concentración de la variante de FVIIa en la muestra de plasma.

C. **Ensayo de coagulación**

Un estuche disponible en el comercio (STACLOT FVIIa-rTF, Diagnostica Stago, Parsippany, NJ) fue utilizado como el ensayo de coagulación. Para determinar la actividad coagulante de los polipéptidos activos de FVIIa, las muestras de plasma fueron ensayadas con un ensayo de coagulación de FVIIa-

323
322

dependiente (FVII: C). El ensayo fue realizado usando las reaccionantes y las instrucciónes proporcionadas en un estuche comercial y el tiempo de coagulación fue medido usando un instrumento electromecánico para la detección del coágulo (STArt4, Diagnostica Stago, Parsippany, NJ). El estuche fue utilizado según la dirección de los fabricantes con las siguientes excepciones: primero, la variante purificada de FVIIa en sí misma fue utilizada para la curva patrón en vez que la estándar de rhFVIIa proporcionadas con el estuche; en segundo lugar, el volumen de los reaccionantes comerciales resultantes fueron utilizados para estudios rutinarios de proyección de farmacocinéticos y dieron resultados comparables a las reaccionantes del estuche: factor de tejido soluble (CalBioChem, La Jolla, Ca) y una mezcla sintética del fosfolípido (lípidos polares de Avanti, alabastro, ALUMINIO), Tampón de TBSA (Tris-NaCl, pH 7.5 con el 1% BSA; DiaPharma, West Chester, Ohio), y solución de cloruro cálcico de 25 µM (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ).

El ensayo de coagulación fue realizada de la siguiente manera. Las muestras de plasma congeladas fueron descongeladas a temperatura ambiente por aproximadamente 45 minutos y luego diluidas en 1:5000 en Tampón. Cincuenta µL del plasma diluido se combino con 50 µL plasma humano Factor VII- deficiente y 50 µL de factor tisular re-lipidados y preincubados por 180 segundos. La siguientes preincubación, 50 µL de solución de cloruro cálcico (25 µM) fue añadida para iniciar coagulación. El tiempo de coagulación fue determinado usando un detector electromecánico de coágulos. Cada muestra

de plasma fue ensayada dos veces. El sistema fue calibrado construyendo una curva estándar usando el tiempo de coagulación de varias diluciones contenidas en el Tampón que tenían una cantidad conocida de la variante específica del FVIIa ensayado. Las concentraciones de FVIIa en las muestras de plasma de ratón fueron calculadas de la porción lineal del registro FVIIa contra la curva estándar de los registros de tiempo de coagulación. La capacidad de las muestras de plasma para inducir la coagulación en el factor VII- plasma deficiente fue informada como ng FVIIa/Ml del plasma de ratón seguido por el historial de la sustracción de tipo endógeno silvestre FVIIa en plasma de ratones ficticios tratados.

La vida media de cada proteína de FVII fue determinado rutinariamente haciendo un ajuste convencional del registro natural de su actividad a una línea recta, y midiendo el tiempo empleado en la actividad de ser reducidas a la mitad las proteínas de FVIIa. Para las proteínas de FVII con multi-disminución del exponencial, La vida media fue determinado de la porción final del registro del plasma VS el tiempo del perfil. Los parámetros farmacocinéticos adicionales fueron calculados usando el programa de computador disponible en el comercio (WinNonLin v5.1, Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

D. **Propiedades farmacocinéticas de CB728, CB735 y CB945**

Usando el protocolo anterior, las propiedades farmacocinéticas de tipo salvaje FVIIa y dos variantes de FVIIa: CB728, CB735 y CB945 fueron evaluados. Los resultados se establecen en la tabla 14. CB735 y CB945

325

324

~~327~~

mostraron avances en los parámetros farmacocinéticos comparados con el tipo salvaje FVIIa.

Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos del ratón de las variantes de FVIIa

CB#	Mutación (Numeración de FVII maduro)	IV Dosis (mg/kg)	AUC $_{0\text{-INF}}$ Plasma (µg.min/mL)/Dosis	Vida media (min)	Cl (mL/min/kg)	Vd (mL/kg)	N
CB553	WT	0.1	606	35.1	2.02	98.8	5
CB553	WT	1.0	798	50.2	1.55	118	2
CB728	Gla Intercambio FIX	0.1	207	19.9	4.85	140	2
CB735	K341D	0.1	2817	106	0.14	22.0	1
CB945	M156Q/K192D	0.1	2430	78.1	0.41	46.3	1

E. Propiedades farmacocinéticas de CB558

La vida media de un polipéptido modificado de FVIIa que mostró creciente resistencia a TFPI (CB-558; con una mutación de K297E) fue medido y comparado con el de una proteína humana recombinante sin modificar de FVIIa (rhFVIIa) (NovoSeven®, Novo Nordisk) en un estudio farmacocinético similar a este descrito anteriormente, con algunas modificaciones. Quince ratones machos CD-I fueron inyectados con una dosis bolo intravenosa 0.5mg/kg de CB-558, y 15 ratones fueron inyectados con una dosis intravenosa del bolo 0.5mg/kg del rhFVIIa. En 5, 15, 30, 60, 120, y 240 minutos después de la inyección, tres ratones de cada protocolo de inyección se les hizo la eutanasia por medio de asfixia con CO2 y aproximadamente 1.0 ml de sangre fueron vertidos en una jeringa de 1.0 ml por medio de una punción cardiaca

percutánea. Cada jeringa fue cargada con suficiente citrato de sodio para lograr una concentración final de 3.2% en 1 mL de sangre. Las muestras de sangre fueron entonces centrifugadas en 9000 rpm por 8 minutos en 4°C. El plasma fue trasladado a tubos de 1.5 ml para ser marcados individualmente (Eppendorf), congelados instantáneamente en nitrógeno líquido y almacenado en -80°C.

Para determinar la actividad coagulante y la vida media de los polipéptidos activos de FVIIa, las muestras de plasma fueron evaluadas en Machaon Diagnostics, Inc. (Oakland, CA) usando un ensayo de coagulación FVIIa-dependiente (FVII: C) y un instrumento automatizado hemostasis (AMAX 190plus, Trinidad Biotech). Brevemente, las muestras de plasma congeladas fueron descongeladas en baños de agua de 37°C por 5 minutos y luego diluidas 1:40 en el Tampón de Veronal. Seis µl del plasma diluido fueron añadidos a 54 µl Tampón de Veronal en una cubeta y mezclados con una perla de metal. Una cantidad igual (60 µl) de factor de plasma humano VII-deficiente (Precision Biologic) fue añadida a la cubeta después, que fue incubada a 37°C por 60 segundos mezclando constante.

Para iniciar la temporización de la reacción, fue añadido a la cubeta 120 µL de tromboplastina (proviene del cerebro del conejo, Tromboplastina-DS; Hemostasis pacífico) y sin parar de mezclar constantemente en todo el proceso. La reacción de coagulación fue controlada foto-óptimamente en 405nm para detectar la formación de fibrina. El sistema fue calibrado analizando el tiempo de coagulación de varias diluciones del plasma en

322
386

referencia con los niveles publicados de FVII (Precision Biologic), y después analizando el tiempo de coagulación del plasma con control normal (Precision Biologic) y del plasma con control anormal (Precision Biologic).

La capacidad de las muestras de plasma para inducir la coagulación del factor de plasma VII-deficiente fue informada como un porcentaje del tiempo de coagulación observado en el plasma humano normal. La actividad coagulante del plasma en ambos casos, FVIIa (NovoSeven®)-tratada y de ratones CB-558-tratada disminuyo con el tiempo. La vida media de cada proteína de FVII fue determinado rutinariamente haciendo un ajuste convencional del registro natural de su actividad a una línea recta, y midiendo el tiempo empleado en la actividad de ser reducidas a la mitad las proteínas de FVIIa. La vida media de CB-558 se observo ser fue aproximadamente dos veces el de FVIIa (NovoSeven®); 156 minutos compararon con 67 minutos.

Ejemplo 10

Generación de variantes adicionales de FVII

Una serie de mutaciones adicionales de FVII fueron generadas para alterar una o más propiedades y/o actividades de FVII. Además de modificaciones para incrementar la resistencia al TFPI, las modificaciones fueron diseñadas para aumentar la resistencia a AT-III, para incrementar la actividad catalítica, extender las vidas medias, y/o acrecentar la afinidad y/o unión a los fosfolípidos, tales como ésos en plaquetas activadas. Las modificaciones incluyen el reemplazo de aminoácidos, la inserción y la supresión. Las variantes de FVII que contienen dos o más modificaciones

328
327

también fueron generadas. La tabla 23 establece las variantes de FVII que fueron generadas y expresadas en las células 293-F Freestyle™. Los reemplazos del aminoácido fueron incorporados en los polipéptidos de FVII usando los métodos descritos en el ejemplo 2.B, en la parte superior de este documento, con un oligonucleótido apropiado.

La tabla 15 de la parte inferior establece las variantes adicionales de FVII que fueron generadas. Las variantes Gla intercambio FVII fueron generadas con los residuos de aminoácidos A1 a Y44 (por la enumeración madura de FVII) en los N-extremos de la proteína del tipo salvaje FVII fue sustituida con los residuos de aminoácidos correspondientes a Gla domain of FIX, FX, la proteína C, la proteína S o trombina. La variante "Gla Intercambio FIX" FVII (es decir. un polipéptido de FVII en el cual el endógeno Gla domain se ha sustituido con el Gla domain de FIX) contiene los residuos de aminoácidos A2 a Y45 con SEQ ID NO: de 110 a los N-términos; la variante de "Gla Intercambio FX" FVII contiene residuos de aminoácidos A1 a Y44 con SEQ ID NO: 111 a los N-términos; la variante "Gla Intercambio de proteína C" FVII contiene residuos de aminoácidos A1 a H44 con SEQ ID NO: 113 a los N-términos, la variante de "Gla Intercambio de proteína S" FVII contiene residuos de aminoácidos A1 a Y44 con SEQ ID NO: 114 a los N-términos y la variante de "Gla Intercambio de trombina" FVII contiene residuos de aminoácidos A1 a Y44 con SEQ ID NO: 115 a los N-términos.

Tabla 15. Variantes ejemplares del factor VII

ID	Variante (Numeración de FVII	**Variante (Numeración de**	**Variante de polipéptidos**

329
328

	maduro)	Quimiotripcina)	Numeración de ID Secuencial
CB697	R290N	R147N	206
CB698	R290Q	R147Q	207
CB699	R290K	R147K	208
CB700	R290M	R147M	209
CB701	R290V	R147V	210
CB733	K341N	K192N	211
CB734	K341M	K192M	212
CB735	K341D	K192D	213
CB853	G237T238insA	G97T98insA	214
CB854	G237T238insS	G97T98insS	215
CB855	G237T238insV	G97T98insV	216
CB856	G237T238insAS	G97T98insAS	217
CB857	G237T238insSA	G97T98insSA	218
CB858	D196K197insK	D60K60ainsK	219
CB859	D196K197insR	D60K60ainsR	220
CB860	D196K197insY	D60K60ainsY	221
CB861	D196K197insW	D60K60ainsW	222
CB862	D196K197insA	D60K60ainsA	223
CB863	D196K197insM	D60K60ainsM	224
CB864	K197I198insE	K60aI60binsE	225
CB865	K197I198insY	K60aI60binsY	226
CB866	K197I198insA	K60aI60binsA	227
CB867	K197I198insS	K60aI60binsS	228
CB637	K197E/K341Q	K60aE/K192Q	229
CB638	K197L/K341Q	K60aL/K192Q	230
CB670	G237V/K341Q	G97V/K192Q	231
CB688	K197E/K199E	K60aE/K60cE	232
CB689	K197E/G237V	K60aE/G97V	233
CB691	K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	250
CB694	K199E/K341Q	K60cE/K192Q	234
CB671	K197E/G237V/K341Q	K60aE/G97V/K192Q	235
CB669	V158D/G237V/E296V/ M298Q	V21D/G97V/E154V/M 156Q	241
CB591	L305V/S314E/ L337A/F374Y	L163V/S170bE/K188A /F225Y	147
CB592	M298Q	M156Q	148
CB593	V158D/E296V/ M298Q	V21D/E154V/M156Q	149
CB594	V158D/E296V/ M298Q/K337A	V21D/E154V/M156Q/ K188A	150
CB690	K197E/G237V/M298Q	K60aE/G97V/M156Q	242
CB692	K197E/G237V/M298Q/ K341Q	K60aE/G97V/M156Q/ K192Q	243

CB693	K197E/K199E/G237V/ M298Q/K341Q	K60aE/K60cE/G97V/ M156Q/K192Q	244
CB695	G237V/M298Q	G97V/M156Q	245
CB696	G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	246
CB902	K197E/M298Q	K60aE/M156Q	248
CB945	M298Q/K341D	M156Q/K192D	249
CB728	Gla intercambio FIX	Gla intercambio FIX	236
CB729	Gla intercambio FX	Gla intercambio FX	237
CB730	Gla Intercambio Prot C	Gla Intercambio Prot C	238
CB731	Gla Intercambio Prot S	Gla Intercambio Prot S	239
CB732	Gla intercambio Thrombin	Gla intercambio Thrombin	240
CB850	M298Q/Gla Intercambio FIX	M156Q/Gla Intercambio FIX	247

Ejemplo 11

Análisis de la actividad catalítica de las variantes de FVIIa para el sustrato, Factor X

La actividad catalítica de las variantes de FVIIa para el sustrato, Factor X (FX), fue evaluada indirectamente en dos tipos de ensayos cromogénicos por medio de pruebas de la actividad de FXa, generada sobre la activación por FVIIa, en el sustrato sintético Spectrafluor FXa. Los dos ensayos fueron realizados tanto en la presencia o en la ausencia de factor de tejido lipidado, para evaluar la actividad tanto de TF-dependiente como de TF-independiente. Las variantes de FVII fueron expresadas, purificadas y activadas a FVIIa como se describe anteriormente en los ejemplos 2 y 3. Aunque casi todas las variantes FVII fueron expresadas solamente en las células 293-F FreestyleTM, algunas también fueron expresadas en las células BHK-21.

Ensayo indirecto del factor de tejido lipidado

331
330

La actividad catalítica de las variantes de FVIIa en presencia del factor de tejido fue evaluado usando el ensayo descrito en el ejemplo 5, arriba, con menores modificaciones. Una de estas modificaciones fue el uso de una proteasa de sustrato del factor X que había sido tratada con ERG-CMK y FFR-CMK para reducir la actividad del antecedente (Moleculares Onnovations). Dos tipos de análisis de datos fueron realizados usando dos ensayos independientes; un ensayo de análisis lineal de intervalos y un ensayo hiperbólico de análisis de intervalos. El ensayo de análisis lineal de intervalo utilizo un rango de concentraciones del factor X entre 0 y 150 nanómetro para asegurar una medición exacta de la constante cinética en el intervalo lineal de la curva de la dosis. En cambio, el ensayo hiperbólico del análisis de intervalo utilizo un rango de las concentraciones del factor X entre 0 y 1.44 µM para asegurar una medición exacta de la constante cinética con una curva (hiperbólica) de la dosis saturada.

El ensayo indirecto del factor de tejido lipidado con los datos del análisis del intervalo lineal fue realizado esencialmente como se describió en el ejemplo 5, arriba, con las siguientes modificaciones. Las soluciones de la variante FVIIa/ TF fueron preparadas como unas soluciones de 0.1 nanómetro FVIIa/ 0.4 nanómetro TF y incubadas por 30 minutos antes de ser diluidas doblemente en 0.4 nanómetros TF hacia una solución que contenga 1.5625 pM FVIIa/0.4 nanómetro TF. Veinticinco µL de la solución de FVIIa/TF fueron mezclados con 25 µL de una solución de sustrato que contenía 1.0 milímetros de Spectrofluor FXa (American Diagnostica) y uno de 300 nanómetros, 200 milímetros, 133.3

332
331
344

nanómetro, 88.9 nanómetro, 59.3, 39.5 nanómetros, 36.3 nanómetros o 0 nanómetros del factor X (Molecular Innovations). Así, las concentraciones finales para el ensayo eran 0.8 pM de FVIIa, 0.2 nanómetros de TF, 0.5 milímetros de Spectrofluor FXa y 150 nanómetros, 100 milímetros, 66.7 nanómetros, 44.4 nanómetros, 29.6 nanómetros, 19.8 nanómetros, 13.2 nanómetros o 0 nanómetros del factor X (Molecular Innovations) en 50µL/poso. La curva patrón de AMC, que sirvió como el factor de conversión para RFU µM en cálculos subsiguientes, fue expandida para incluir un intervalo de dosis que cubriera desde 0 µM al 100 µM AMC.

El ensayo indirecto del factor de tejido lipidado con los datos del análisis del intervalo hiperbólico fue realizado esencialmente como descrito en el ejemplo 5, arriba, con las siguientes modificaciones. Las soluciones de la variante FVIIa/ TF fueron preparadas como unas soluciones de 0.1 nanómetro FVIIa/ 0.4 nanómetro TF y incubadas por 30 minutos antes de ser diluidas doblemente en 0.4 nanómetros TF hacia una solución que contenga 1.5625 pM (o 0.78 pM debido a expectativas de proteasas con alta actividad) FVIIa/0.4 nanómetro TF. Veinticinco µL de la solución de FVIIa/TF fueron mezclados con 25 µL de una solución de sustrato que contenía 1.0 milímetros de Spectrofluor FXa (American Diagnostica) y uno de 1440 nanómetros, 720 milímetros, 360 nanómetros, 180 nanómetros, 90 nanómetros, 45 nanómetros, 22.5 nanómetros o 0 nanómetros del factor X (Molecular Innovations). Así, las concentraciones finales para el ensayo fueron 0.8 (o 0.39) pM FVIIa, 0.2 nanómetros TF, 0.5 milímetros Spectrofluor FXa y 7 nanómetros, 720

3533
332
2UF

milímetros, 360 nanómetros, 180 nanómetros, 90 nanómetros, 45 nanómetros, 22.5 nanómetros, 11.25 nanómetros o 0 nanómetros del factor X (Molecular Innovations) en 50 µL/poso. Los parámetros k_{cat} y el K_m son calculado usando la ecuación hiperbólica de Michaelis Menton de la forma (V_{max}/(1+ (K_m/ x))). La curva patrón de AMC, que sirvió como el factor de conversión para RFU µM en cálculos subsiguientes, fue expandida para incluir un intervalo de dosis que cubriera desde 0 µM a 100 µM AMC.

Para determinar los constantes de velocidad cinética para la activación de la variante de FVIIa o de FVIIa de FX, los datos primos recogidos con la aplicación del programa para computadores de SoftMax (Molecular devices) fue exportada como archivos .XML. Complementarios análisis de datos lineales y no lineales fueron realizados con XLfit4, un paquete del programa de computadores para automatizar el ajuste de las curvas y los análisis estadísticos dentro del entorno de las hojas de cálculo de Microsoft (programa de computador IDBS).

Para los datos recogidos usando el ensayo de intervalo lineal, las constantes cinética k_{cat} /K_m (M^{-1} sec^{-1}) son calculados directamente de la pendiente del análisis de regresión lineal de la concentración de FX FRENTE la velocidad de la escisión fluoro génica del sustrato (en µM/ sec^2) donde k_{cat} /K_m = pendiente/ [FVIIa] x 0.5x k_2. El factor de corrección k_2 fue determinado para ser 45 usando el procedimiento descrito en el ejemplo 5 y la constante cinética para la escisión de FXa de Spectrofluor FXa del $k_{cat,FXa}$ = 56 sec-1 y $K_{m,FXa}$ = 126 nanómetro, determinados experimentalmente con FX activado (FXa) que

334
333

era previamente un sitio activo calibrado con AT-III/ heparin. Excluyendo datos puntuales que resultaron en los valores menores a 0.98 de R^2 asegurado la linealidad de los conjuntos de datos utilizados en la rutina del ajuste.

El análisis de los datos recogidos usando el ensayo hiperbólico de intervalos fueron calculados de un análisis de regresión no lineal de la concentración de FX frente la velocidad de la escisión fluoro génica del sustrato (en µM/ sec^2). Los parámetros individuales del k_{cat} y el K_m son calculados como parámetros de ajuste usando la ecuación hiperbólica de Michaelis Menton de la forma (V_{max}/ (1 + (K_m/ x))) donde $k_{cat} = V_{max}$ / [FVIIa] x 0.5 x k_2. La constante cinética, kcat / Km fue calculada de los parámetros enposodos individualmente de kcat y de Km.

Ensayo indirecto del factor-independiente del tejido

La actividad catalítica de las variantes de FVIIa en presencia del factor de tejido fue evaluada en un ensayo indirecto similar a el descrito anteriormente, salvo que el factor de tejido no fue incluido en el ensayo anterior. Así, el ensayo para evaluar la actividad TF-independiente fue realizado esencialmente como se describe anteriormente, con las siguientes modificaciones. Las soluciones de la variante de FVIIa fueron diluidas a 50 nanómetros. Veinticinco µL de cada solución de FVIIa fueron mezclados con 25 µL de una solución de sustrato que contuvo 1.0 milímetros Spectrofluor FXa (American Diagnostica) y uno de 1050 nanómetros, 700 milímetros, 466.7 nanómetros, 311.1 nanómetros, 207.4 nanómetros, 138.3 nanómetros, 92.2 nanómetros o 0 nanómetros del factor X (Molecular Innovations). Así, las

334

concentraciones finales para el ensayo eran 25 nanómetro FVIIa, 0.5 milímetros Spectrofluor FXa y 525 milímetros, 350 nanómetros, 233.3 nanómetros, 155.6 nanómetros, 103.7 nanómetros, 69.1 nanómetros, 46.1 nanómetros o 0 nanómetros del factor X (Molecular Innovations) en 50 µL/ poso. Los análisis de los datos fueron realizados como se describió para el ensayo del intervalo lineal, en la parte superior y sin modificaciones.

Las Tablas 16-18 proporcionan los resultados de los ensayos que fueron realizados para medir la actividad catalítica de las variantes de FVIIa. La tabla 15 y 16 proporciona la actividad catalítica como fue medida en un ensayo indirecto TF-dependiente usando los polipéptidos de FVIIa expresados como las células 293-F y de las células BHK-21, respectivamente, y la Tabla 17 proporciona la actividad catalítica como fue medida en un ensayo indirecto TF-independiente usando los polipéptidos de FVIIa expresados desde las células 293-F y/o las células BHK-21. Los resultados son presentados como la constante cinética para la actividad catalítica, k_{cat} / K_m (M^{-1} seg^{-1}), y también expresado como porcentaje de la actividad del salvaje-tipo FVIIa, en donde la actividad es actividad catalítica, k_{cat} / K_m (M^{-1} seg^{-1}) de cada variante de FVIIa para su sustrato, FX. El uso del análisis de datos de intervalos lineal o hiperbólico también es indicado para los valores presentados en las tablas. No todas las variantes de FVIIa fueron ensayadas en cada ensayo. Algunas de las variantes de FVII ensayadas en el ejemplo 5, en la parte anterior, muestra levemente reducción o aumento de la actividad catalítica para FX en este conjunto de ensayos comparado con el ensayo descrito en el ejemplo 5. La

diferencia en las actividades de estos, vista en el Ejemplo 5 pueden ser debido a los antecedentes de actividades variadas de los residuos de FXa en el sustrato de FX obtenido de American Diagnostica. Las distintas variantes de FVIIa mostraron una actividad catalítica creciente comparada con la molécula de FVIIa de tipo salvaje. Por ejemplo, CB760, que contiene la mutación de Q366V, tiene una actividad catalítica entre de 1.5 y 5 veces que la de FVIIa de tipo salvaje.

Tabla 16. Actividad catalítica de las variantes de FVIIa: Ensayo indirecto de TF-Dependiente con los polipéptidos de FVIIa de las células 293-F

ID	Mutación (Numeración de FVII maduro)	Mutación (Numeración Quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% WT)	Formato de ensayo
CB553	WT	WT	3.42×10^7	100	Lineal
CB554	D196K	D60K	1.10×10^7	23	hiperbólica
CB555	D196R	D60R	2.25×10^7	46	hiperbólica
CB556	D196A	D60A	2.58×10^7	53	hiperbólica
CB557	K197D	K60aD	3.05×10^7	63	hiperbólica
CB558	K197A	K60aE	1.54×10^7	32	hiperbólica
CB559	K197E	K60aA	3.67×10^7	75	hiperbólica
CB560	K197L	K60aL	1.51×10^7	31	hiperbólica
CB561	K197Y	K60aY	5.16×10^7	106	hiperbólica
CB562	K197D	K60cD	4.62×10^7	95	hiperbólica
CB563	K197E	K60cE	3.63×10^7	74	hiperbólica
CB56	K197A	K60cA	5.56×10^7	114	hiperbólica

332
336

4					
CB565	T239A	T99A	1.66×10^7	34	hiperbólica
CB566	R290D	R147D	5.80×10^6	12	hiperbólica
CB567	R290E	R147E	6.18×10^6	13	hiperbólica
CB568	R290A	R147A	8.25×10^6	17	hiperbólica
CB569	K341R	K192R	3.95×10^7	81	hiperbólica
CB579	D196R/R290E	D60R/R147E	2.31×10^6	5	hiperbólica
CB580	D196K/R290E	D60K/R147E	7.81×10^4	0	hiperbólica
CB581	D196R/R290D	D60R/R147D	2.91×10^6	6	hiperbólica
CB586	D196R/ K197E/ K199E	K60cE/K60aE/D60R	7.97×10^6	16	hiperbólica
CB587	D196K/ K197E/ K199E	K60cE/K60aE/D60K	7.22×10^6	15	hiperbólica
CB588	D196R/ K197E/ K199E/R290E	K60cE/K60aE/D60R/R147E	3.66×10^5	1	hiperbólica
CB589	D196R/ K197M/ K199E	K60cE/K60aM/D60R	1.81×10^7	37	hiperbólica
CB590	D196R/ K197M/ K199E/R290E	K60cE/K60aM/D60R/R147E	2.88×10^5	1	hiperbólica
CB591	L305V/S314E/L337A/F374Y	L163V/S170bE/K188A/F225Y	6.73×10^7	138	hiperbólica
CB592	M298Q	M156Q	1.40×10^8	409	Lineal
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	1.67×10^8	487	Lineal
CB594	V158D/E296V/M298Q/K337A	V21D/E154V/M156Q/K188A	5.18×10^8	1061	hiperbólica
CB595	K197I	K60aI	5.31×10^7	109	hiperbólica
CB596	K197V	K60aV	5.15×10^7	106	hiperbólica
CB597	K197F	K60aF	7.20×10^7	148	hiperbólica

350
337
350

CB598	K197W	K60aW	6.25×10^7	128	hiperbólica
CB599	K197M	K60aM	7.83×10^7	160	hiperbólica
CB600	D196F	D60F	2.35×10^7	48	hiperbólica
CB601	D196Y	D60Y	6.93×10^7	142	hiperbólica
CB602	D196W	D60W	3.40×10^7	70	hiperbólica
CB603	D196L	D60L	8.57×10^7	176	hiperbólica
CB604	D196I	D60I	7.99×10^7	164	hiperbólica
CB605	G237W	G97W	8.63×10^7	177	hiperbólica
CB606	G237T	G97T	3.13×10^7	64	hiperbólica
CB608	G237V	G97V	8.91×10^7	183	hiperbólica
CB609	K341Q	K192Q	1.56×10^7	32	hiperbólica
CB611	K197L/D196L	K60aL/D60L	4.39×10^7	90	hiperbólica
CB612	K197L/D196F	K60aL/D60F	3.79×10^6	8	hiperbólica
CB613	K197L/D196M	K60aL/D60M	1.86×10^7	38	hiperbólica
CB614	K197L/D196W	K60aL/D60W	9.81×10^6	20	hiperbólica
CB615	K197E/D196F	K60aE/D60F	1.87×10^7	38	hiperbólica
CB616	K197E/D196W	K60aE/D60W	3.50×10^7	72	hiperbólica
CB617	K197E/D196V	K60aE/D60V	6.50×10^6	13	hiperbólica
CB637	K197E/K341Q	K60aE/K192Q	7.22×10^6	15	hiperbólica
CB638	K197L/K341Q	K60aL/K192Q	6.66×10^6	14	hiperbólica
CB669	V158D/G237V/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q/G97V	6.70×10^7	196	Lineal
CB670	G237V/K341Q	K192Q/G97V	1.57×10^7	32	hiperbólica

339
338
337

CB671	K197V/G237V/K341Q	K60aE/K192Q/G97V	7.05×10^6	21	Lineal
CB688	K197E/K199E	K60aE/K60cE	9.85×10^6	20	hiperbólica
CB689	K197E/G237V	K60aE/G97V	1.32×10^7	27	hiperbólica
CB690	K197E/G237V/M298Q	K60aE/G97V/M156Q	3.19×10^7	93	Lineal
CB691	K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	3.89×10^6	8	hiperbólica
CB692	K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	6.42×10^6	13	hiperbólica
CB693	K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/K60cE/G97V/M156Q/K192Q	3.49×10^6	7	hiperbólica
CB694	K199E/K341Q	K60cE/K192Q	7.64×10^6	16	hiperbólica
CB695	G237V/M298Q	G97V/M156Q	4.30×10^7	125	Lineal
CB696	G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	4.25×10^7	124	Lineal
CB697	R290N	R147N	1.36×10^7	28	hiperbólica
CB698	R290Q	R147Q	8.59×10^6	18	hiperbólica
CB699	R290K	R147K	1.52×10^7	31	hiperbólica
CB700	R290M	R147M	1.23×10^7	25	hiperbólica
CB701	R290V	R147V	2.66×10^6	5	hiperbólica
CB728	Gla intercambio FIX	Gla intercambio FIX	3.83×10^7	112	Lineal
CB729	Gla intercambio FX	Gla intercambio FX	9.46×10^6	19	hiperbólica
CB730	Gla Intercambio Protein C	Gla Intercambio Prot C	3.19×10^6	7	hiperbólica
CB732	Gla intercambio Thrombin	Gla intercambio Thrombin	1.04×10^7	21	hiperbólica
CB85	M298Q/Gla	M156Q/Gla	7.51×10^7	219	Lineal

340

339

0	Intercambio FIX	intercambio FIX			
CB733	K341N	K192N	2.35×10^7	69	Lineal
CB734	K341M	K192M	8.35×10^6	17	hiperbólica
CB735	K341D	K192D	1.44×10^7	42	Lineal
CB854	G237T238insS	G97T98insS	1.32×10^7	38	Lineal
CB855	G237T238insV	G97T98insV	1.23×10^7	36	Lineal
CB856	G237T238insAS	G97T98insAS	1.12×10^7	33	Lineal
CB858	D196K197insK	D60K60ainsK	3.03×10^7	88	Lineal
CB859	D196K197insR	D60K60ainsR	4.81×10^7	140	Lineal
CB860	D196K197insY	D60K60ainsY	3.93×10^7	115	Lineal
CB866	K197I198insA	K60aI60binsA	4.11×10^7	120	Lineal
CB902	K197E/M298Q	K60aE/M156Q	9.68×10^7	283	Lineal

Tabla 17. Actividad catalítica de las variantes de FVIIa: Ensayo indirecto TF-Dependiente con los polipéptidos de FVIIa de las células BHK-21

ID	Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% WT)	Formato de Ensayo
CB553	WT	WT	5.42×10^7	100	Lineal
CB592	M298Q	M156Q	9.34×10^7	172	Lineal
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	2.04×10^8	376	Lineal
CB728	Gla swap FIX	Gla swap FIX	8.70×10^7	160	Lineal
CB735	K341D	K192D	1.02×10^7	19	Lineal
CB853	G237T238insA	G97T98insA	1.60×10^7	30	Lineal

341
340
352

CB854	G237T238insS	G97T98insS	1.67×10^7	31	Lineal
CB855	G237T238insV	G97T98insV	1.66×10^7	31	Lineal
CB856	G237T238insAS	G97T98insAS	1.68×10^7	31	Lineal
CB857	G237T238insSA	G97T98insSA	1.83×10^7	34	Lineal
CB858	D196K197insK	D60K60ainsK	3.55×10^7	65	Lineal
CB859	D196K197insR	D60K60ainsR	7.24×10^7	133	Lineal
CB862	D196K197insA	D60K60ainsA	4.31×10^7	79	Lineal
CB863	D196K197insM	D60K60ainsM	3.61×10^7	67	Lineal
CB864	K197I198insE	K60aI60binsE	2.80×10^7	52	Lineal
CB865	K197I198insY	K60aI60binsY	4.27×10^7	79	Lineal
CB867	K197I198insS	K60aI60binsS	6.35×10^7	117	lineal
CB945	M298Q/K341D	M156Q/K192D	1.04×10^7	19	

Tabla 18. Actividad catalítica de las variantes de FVIIa: Ensayo indirecto TF-Independiente

ID	Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Células 293-F		Células BHK-21	
			k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% WT)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% WT)
CB553	WT	WT	22.60	100	1.58	100
CB592	M298Q	M156Q	485.5	2029	310.25	1969
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	5493.68	24313	3217.77	20423
CB669	V158D/G237V/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q/G97V	2145.3	9494		
CB692	K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	1	4		
CB695	G237V/M298Q	G97V/M156Q	24.35	108		
CB728	Gla swap FIX	Gla swap FIX	110	486	24	154
CB850	M298Q/Gla Swap FIX	M156Q/Gla swap FIX	15.4	68		
CB902	K197E/M298Q	K60aE/M156Q	8.55	38		

Ejemplo 12

Determinación de la inhibición de FVIIa/TF o de FVIIa por AT-III/heparina

La potencia de la interacción entre el complejo de AT-III/heparina y FVIIa en la presencia o la ausencia del factor de tejido soluble (sTF), es decir. TF-dependiente o TF- independiente, fue evaluado midiendo el nivel de inhibición de diferentes concentraciones de AT-III en la actividad catalítica de FVIIa/sTF hacia un sustrato, Mesil-FPR-ACC. El valor $K_{0.5}$ fue determinado para cada variante de FVIIa probada, que corresponde a la concentración molar de AT-III que fue requerido para la inhibición del 50% (IC_{50}) de la variante de FVIIa en un ensayo de 30 minutos a temperatura ambiente (~25°).

Dos ensayos fueron preparados por separado, uno con TF y uno sin TF. Una solución de 2μM de AT-III/heparina (5 mM finales de heparina) fue preparada mezclando 26.4 μL de 151.7 μM AT-III (el plasma purificó AT-III humano; Innovaciones moleculares) con 50 μL de 0.2 mM de heparina de LMW (CalBiochem), 400 μL de 5^x tapón de ensayo (100 mM de Hepes, 750 mM de NaCl, 25 mM de $CaCl^2$, 0.05% BSA, 0.5% PEG 8000, pH 7.4) y 1.523 mL del agua de calidad reactiva. Esta solución estaba para ser usada en su más alta concentración alta en el ensayo dependiente del TF-. Una solución que contenía 4 μM AT-III/heparina (5 mM finales de heparina) fue preparada para el uso en el ensayo del TF-independiente, mezclando 52.8 μL de 151.7 μM AT-III (innovaciones moleculares) con 50 μL de 0.2 mM de heparina de LMW (CalBiochem), 400 μL 5^x tapón de ensayo y 1.497 mL agua de calidad reactiva. Las soluciones de AT-III/heparina fueron incubadas de 5 a 10 minutos a

343

temperatura ambiente y después diluidas dos veces en una placa profunda 96 de de polipropileno, con un volumen final de 1 mL que contenía la heparina de 5 µM, dando por resultado diluciones de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 0 nM, ó de 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 0 nM. Las variantes de FVIIa y el tipo-salvaje de FVIIa fueron diluidos a 250 nM 1^x en un tapón de ensayo de (20 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, 5 mM de $CaCl_2$, 0.01% BSA, 0.1% PEG 8000, pH 7.4). Para el ensayo de TF-dependiente, complejos de 5 nM de FVIIa/50 nM de sTF eran formados al mezclar 20 µL de FVIIa con 10 µL de 5 µM de sTF (Sistemas R&D de Factor III de Coagulación Humana: #2339-PA), 200 µL 5^x en tapón de ensayo y 770 µL de agua de calidad reactiva e incubando las soluciones de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Para el ensayo TF-independiente, 100 µL de FVIIa fueron mezclados con 200 µL 5^x en tapón de ensayo y 700 µL de agua de calidad reactiva para producir soluciones de 25 nM de FVIIa. Para comenzar el ensayo, 25 µL de FVIIa/TF o sólo soluciones de FVIIa fueron mezcladas por separado con 25 µL de cada dilución de AT-III/heparina en pozos de placa 96 de ensayo de media área negra (Nunc). Las condiciones de ensayo finales para el ensayo TF-dependiente eran 2.5 nM de sTF de FVIIa/25 nM y de concentraciones de AT-III/heparina en rangos desde 1000 nM a 0 nM. Para el ensayo TF-independiente, las concentraciones de FVIIa eran de 12.5 nM de FVIIa y las concentraciones de AT-III/heparina se extendieron en rangos desde 2000 nM a 0 nM. Las placas fueron incubadas por 30 minutos con agitación a temperatura ambiente (25°C).

Una solución de reserva del sustrato de FVIIa (Mesil-FPR-ACC) fue preparada disolviendo el sustrato en DMSO a 20 mM, después preparando una solución de trabajo de 0.5 mM 1^x en tapón de ensayo. Seguida por la incubación de la placa de ensayo de arriba, 50 µL del sustrato de FVIIa fue añadida a cada pozo de placas de ensayo. Las reacciones fueron mezcladas y la actividad residual de FVIIa fue evaluada siguiendo las velocidades iniciales de división del sustrato por 15 minutos bajo un lector fluorescente graduado a 30°C.

Para determinar el nivel de inhibición por AT-III/heparina para las variantes de FVIIa o de FVIIa, los datos primos recogidos con la aplicación SoftMax Pro (dispositivos moleculares) fueron exportados como archivos .XML. Otros análisis no lineares de los datos fueron realizadas con XLfit4, un programa para el análisis automatizado del ajuste y estadísticas de la curva, dentro de la hoja de cálculo de Microsoft Excel (programa de IDBS). La plantilla de la hoja de cálculo era utilizada calcular la serie de la dilución de AT-III, la relación de AT-III con FVIIa, y las relaciones de Vi/Vo para cada replica de FVIIa en cada concentración experimental de AT-III. Los análisis de regresión no lineares de la actividad residual de FVIIa (expresada como Vi/Vo) frente a la concentración de AT-III eran procesadas con XLfit4 y una ecuación hiperbólica de inhibición de la forma ((C+ (Amp* (1-(X/($K_{0.5}$+X))))); donde C = el desplazamiento (fijado en 0 para permitir la extrapolación de los conjuntos de datos, que no alcanzan al 100% de la inhibición durante el curso del ensayo), amperio = la amplitud del ajuste y $K_{0.5}$, el cual corresponde a la concentración

345

344

de AT-III requerido para la inhibición media-máxima bajo condiciones de ensayo. Para muchas de las variantes de FVIIa, AT-III fue inhibido menos del 20 al 25% de la actividad de la proteasa, a la mayor concentración probada de AT-III, representando un límite superior de detección para el ensayo. Las variantes con menos del 20 al 25% de la máxima inhibición, les fueron por lo tanto asignadas un valor más bajo del límite $K_{0.5}$ (5 µM para TF-dependiente y 10 µM para TF-independiente) y en la mayoría de los casos son esperadas unas resistencias de AT-III mayores al valor reportado.

Las tablas 19 y 20 proporcionan los resultados de los ensayos, que fueron realizados usando las variantes de FVIIa expresadas en células de Freestyle TM 293-F y/o células de BHK-21, en la presencia y la ausencia de TF, respectivamente. Los resultados fueron ambos presentados como el parámetro ajustado de $K_{0.5}$ y como representación de la extensión de la resistencia de AT-III para cada variante, comparada con el tipo-salvaje de FVIIa expresado por la relación de sus valores ajustados de $K_{0.5}$ (variante de $K_{0.5}$ / tipo-salvaje de $K_{0.5}$). Muchas de las variantes de FVIIa exhibieron resistencia creciente a AT-III comparadas con el tipo-salvaje de FVIIa.

Tabla 19. Inhibición de las variantes de FVIIa por AT-III/heparina en presencia de TF

346

FVIIa	Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	TF-Dependiente de ATIII Ensayo de Resistencia			
			Células 293-F		Células BHK-21	
			$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5wt}$	$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5wt}$
CB553	WT	WT	72.3	1.0	56.0	1.0
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	75.1	1.0	79.0	1.4
CB609	K341Q	K192Q	104.5	1.4		
CB733	K341N	K192N	41.2	0.6		
CB734	K341M	K192M	78.2	1.1		
CB735	K341D	K192D	1985.8	27.5		
CB853	G237T238insA	G97T98insA			169.5	3.0
CB854	G237T238insS	G97T98insS			163.9	2.9
CB855	G237T238insV	G97T98insV	189.6	2.6		
CB856	G237T238insAS	G97T98insAS			391.4	7.0
CB857	G237T238insSA	G97T98insSA			266.9	4.8
CB858	D196K197insK	D60K60ainsK			64.9	1.2
CB859	D196K197insR	D60K60ainsR			34.0	0.6
CB860	D196K197insY	D60K60ainsY	29.5	0.4		
CB862	D196K197insA	D60K60ainsA			60.7	1.1
CB863	D196K197insM	D60K60ainsM			55.9	1.0
CB864	K197I198insE	K60aI60binsE			183.7	3.3
CB865	K197I198insY	K60aI60binsY			66.5	1.2
CB867	K197I198insS	K60aI60binsS			82.7	1.5
CB728	Gla swap FIX	Gla swap FIX	68.8	1.0		

Tabla 20. Inhibición de las variantes de FVIIa por AT-III/heparina en la ausencia de TF

FVIIa	Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	TF-Independiente de ATIII Ensayo de Resistencia			
			Células 293-F		Células BHK-21	
			$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5wt}$	$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5wt}$
CB553	WT	WT	2265.8	1.0	2222.7	1.0
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	389.7	0.2	415.6	0.2
CB609	K341Q	K192Q	4622.6	2.0		
CB733	K341N	K192N	1554.4	0.7		
CB734	K341M	K192M	5523.9	2.4		
CB735	K341D	K192D	10000.0	>4.4		

347

346

CB853	G237T238insA	G97T98insA			10000.0	>4.5
CB854	G237T238insS	G97T98insS			10000.0	>4.5
CB855	G237T238insV	G97T98insV	10000.0	>4.4		
CB856	G237T238insAS	G97T98insAS			10000.0	>4.5
CB857	G237T238insSA	G97T98insSA			10000.0	>4.5
CB858	D196K197insK	D60K60ainsK			9329.6	4.2
CB859	D196K197insR	D60K60ainsR			4322.6	1.9
CB860	D196K197insY	D60K60ainsY	2053.3	0.9		
CB862	D196K197insA	D60K60ainsA			7414.3	3.3
CB863	D196K197insM	D60K60ainsM			7299.4	3.3
CB864	K197I198insE	K60aI60binsE			10000.0	>4.5
CB865	K197I198insY	K60aI60binsY			8800.4	4.0
CB867	K197I198insS	K60aI60binsS			10000.0	>4.5
CB728	Gla swap FIX	Gla swap FIX	1005.2	0.4		

Ejemplo 13

Determinación de la resistencia a TFPI de las variantes de FVIIa

La resistencia de las diversas variantes de FVIIa a TFPI fue evaluada usando el ensayo descrito en el Ejemplo 7, arriba. La tabla 21 proporciona los resultados de los ensayos. Los resultados son expresados como la resistencia de pliegue de cada variante de FVIIa a TFPI, comparados con el tipo-salvaje de FVIIa.

Tabla 21. Inhibición de las variantes de FVIIa por TFPI

ID	Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	TFPI resistencia a doblez
CB553	wt	wt	1.0
CB554	D196K	D60K	0.6
CB555	D196R	D60R	0.5
CB556	D196A	D60A	<0.3
CB557	K197D	K60aD	3.0
CB558	K197A	K60aE	1.3
CB559	K197E	K60aA	0.7

343

CB560	K197L	K60aL	16.0
CB561	K197Y	K60aY	1.5
CB562	K197D	K60cD	0.9
CB563	K197E	K60cE	1.3
CB564	K197A	K60cA	0.9
CB565	T239A	T99A	4.5
CB566	R290D	R147D	3.3
CB567	R290E	R147E	6.1
CB568	R290A	R147A	2.8
CB569	K341R	K192R	4.1
CB579	D196R/R290E	D60R/R147E	0.4
CB580	D196K/R290E	D60K/R147E	0.7
CB581	D196R/R290D	D60R/R147D	0.4
CB586	D196R/ K197E/ K199E	D60R/K60aE/K60cE	<0.3
CB587	D196K/ K197E/ K199E	D60K/K60aE/K60cE	0.3
CB588	D196R/ K197E/ K199E/R290E	D60R/K60aE/K60cE/R147E	0.4
CB589	D196R/ K197M/ K199E	D60R/K60aM/K60cE	0.6
CB590	D196R/ K197M/ K199E/R290E	D60R/K60aM/K60cE/R147E	0.9
CB591	L305V/S314E/L337A/F374Y	L163V/S170bE/K188A/F225Y	0.6
CB592	M298Q	M156Q	0.5
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	0.8
CB594	V158D/E296V/M298Q/K337A	V21D/E154V/M156Q/K188A	0.3
CB595	K197I	K60aI	0.8
CB596	K197V	K60aV	0.6
CB597	K197F	K60aF	<0.3
CB598	K197W	K60aW	<0.3
CB599	K197M	K60aM	0.3
CB600	D196F	D60F	<0.3
CB601	D196Y	D60Y	<0.3
CB602	D196W	D60W	<0.3
CB603	D196L	D60L	<0.3
CB604	D196I	D60I	<0.3
CB605	G237W	G97W	<0.3
CB606	G237T	G97T	0.3
CB608	G237V	G97V	0.8
CB609	K341Q	K192Q	12.2
CB611	K197L/D196L	K60aL/D60L	<0.3
CB612	K197L/D196F	K60aL/D60F	<0.3
CB614	K197L/D196W	K60aL/D60W	<0.3
CB615	K197E/D196F	K60aE/D60F	<0.3
CB617	K197E/D196V	K60aE/D60V	<0.3
CB637	K197E/K341Q	K60aE/K192Q	80.7
CB638	K197L/K341Q	K60aL/K192Q	39.0

349

348

RC1

CB670	G237V/K341Q	G97V/K192Q	14.1
CB671	K197V/G237V/K341Q	K60aE/G97V/K192Q	18.9
CB688	K197E/K199E	K60aE/K60cE	2.1
CB689	K197E/G237V	K60aE/G97V	1.7
CB691	K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	34.3
CB692	K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	15.2
CB693	K197E/K199E/G237V/M298Q/ K341Q	K60aE/K60cE/G97V/M156Q/ K192Q	22.1
CB694	K199E/K341Q	K60cE/K192Q	19.1
CB696	G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	3.2
CB697	R290N	R147N	1.5
CB698	R290Q	R147Q	1.2
CB699	R290K	R147K	0.6
CB700	R290M	R147M	1.0
CB701	R290V	R147V	2.5
CB733	K341N	K192N	10.7
CB734	K341M	K192M	4.4
CB735	K341D	K192D	148.0

Ejemplo 14

Evaluación *In vivo* de la actividad pro-coagulante del polipéptido de FVIIa

El modelo con el ratón de hemofilia A, fue establecido para evaluar la actividad pro-coagulante de los polipéptidos de FVIIa. La hemofilia A fue inducida en ratones de CD-1 en la administración de los anticuerpos del anti-FVIII, seguida por la eliminación quirúrgica de las puntas de las colas para iniciar la hemorragia (similar a lo anteriormente descrito, en el ejemplo 8). Ratones deficientes en FVIII (los ratones $FVIII^{-/-}$) también fueron utilizados, pero no fueron tratados con los anticuerpos del anti-FVIII. Los ratones entonces fueron tratados con el polipéptido de FVIIa y la cantidad de sangre perdida en 20 minutos fue medida para determinar la actividad pro-coagulante de los polipéptidos de FVIIa.

350

A. Análisis de la actividad del coagulante de FVIIa en ratones de CD-1 con la inducción de la hemofilia A

Los experimentos iniciales fueron realizados para determinar la dosis requerida, tiempo y duración del efecto de los anticuerpos anti-humanos-FVIII, cuando son administrados por vía intraperitoneal para inducir hemofilia en ratones CD-1. Para el primer lote de anti-FVIII (lote 1; Afinidades Biológicas, lote IG129R4), este estaba basado inicialmente en la dosis utilizada para los experimentos de canulación, anteriormente descritos en el ejemplo 8. La dosis determinada para causar un estado hemofílico (hemorragia incontrolada sobre un periodo de 20 minutos del ensayo) fue de 7.54 mg/ratón (80 µL de 94.25 mg/ml solución de reserva). Este lote tenía una actividad neutralizadora de 612 ratón BU/ml. Para el segundo lote de FVIII anti-humano (lote 2; Afinidades Biológicas, lote IG1577R2, la actividad neutralizadora de 474 ratón BU/ml) la dosis utilizada fue de 11.98 mg/ratón (120 µL de 99.8 mg/ml de solución de reserva) y fueron administradas 6 horas antes del corte de la cola.

Para inducir hemofilia, los ratones masculinos de CD-1 (25-35 g) fueron dosificados intraperitonealmente al lote 1 o al lote 2 de anti-FVIII antes del experimento. CD-1 masculino y los ratones $FVIII^{-/-}$ fueron anestesiados con la administración intraperitoneal de un cóctel de la quetamina/xilazina (solución de 100 mg/mL) y colocados en una plataforma calentada (39°C), para asegurarse de que no hubiera una caída en la temperatura corporal. La habitación del procedimiento fue mantenida en una temperatura de 82°F. Diez minutos antes del corte de la cola, la cola fue sumergida en 10 mls de PBS precalentado (tubo

centrífugo de 15ml; 39°C). Ocho a diez ratones fueron inyectados con FVIIa humano recombinante (Novoseven®, Novo Nordisk) o polipéptidos modificados de FVII diluidos en un tapón compuesto de 52 mM de cloruro sódico, 10.2 mM de cloruro cálcico deshidratado, 9.84 mM de glicilglicina, 0.01% de polisorbato 80 y 165 mM de manitol, vía la vena de la cola en una sola inyección. El vehículo sólo, también fue inyectado en un grupo de ratones como control. Si la inyección falto, el animal fue excluido del estudio. La inyección con el agente de ensayo o el vehículo, fue hecha 5 minutos antes de la corte de la cola. Un corte de la cola fue hecho usando una hoja de afeitar, a 5 mm del extremo de la cola y la sangre fue recogida en PBS, por un período de 20 minutos. Al final del periodo de colección, la pérdida de sangre del total fue evaluada. Los tubos de la colección fueron mezclados y una alícuota de 1 ml de cada muestra fue obtenida y ensayada por el contenido de hemoglobina. El Triton X-100 fue diluido 1 en 4 en agua estéril y 100 µL fueron añadidos a las muestras de 1 mL para causar hemólisis. La absorbancia de las muestras fue medida entonces a una longitud de onda de 546 nm. Para calcular la cantidad de sangre perdida, la absorbancia fue leída contra una curva estándar, generada midiendo la absorbancia en 546 nm de volúmenes conocidos de sangre del múrido, diluidos en PBS y hemolisada, como anteriormente, con el Triton X 100.

Un estudio de la dosis respuesta en el cual 0.3, 1 o 3 mg/kg de CB553 (tipo-salvaje de FVIIa) fueron evaluados, también fue realizado. Ratones que recibieron el vehículo perdieron 1002.3 ± 60.71 µL en el ensayo de 20 minutos. Esto fue reducido perceptiblemente en los ratones que fueron administrados 3

352
351

mg/kg de CB553, a 415.5 ± 90.85 µL ($p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido por la posprueba de Dunn). Reduciendo la dosis a 1 mg/kg resultó en la pérdida de sangre de 679.57 ± 83.95 µL y una dosis más baja de 0.3 mg/kg resultó en la pérdida de sangre de 852.42 ± 94.46 µL.

En un estudio por separado, CB735 (K341D) y CB945 (M298Q/K341D) fueron evaluados con una dosis de 3 mg/kg. La inyección del vehículo sólo, fue utilizada como control. Grupos de ratones que recibieron el vehículo sólo, perdieron entre 803 ± 92.18 µL y 813.1 ± 82.66 µL de sangre en el ensayo de 20 minutos. Esto fue similar al tratamiento con CB735 ó CB945, el cual resultó en 746 ± 110.5 µL y 870.9 ± 78.38 µL pérdida de sangre, respectivamente.

B. Análisis de la actividad del coagulante de FVIIa en ratones de FVIII$^{-/-}$

Un modelo con el ratón de hemofilia A usando los ratones deficientes en FVIII (ratones de FVIIF$^{-/-}$), también fue utilizado para ensayar la actividad del coagulante de los polipéptidos de FVIIa, usando los mismos protocolos descritos anteriormente, salvo que los ratones no fueron tratados con los anticuerpos del anti-FVIII.

1. Estudio de la respuesta a la dosis de la actividad del coagulante de tipo-salvaje FVIIa

Estudios sobre la respuesta a la dosis, para evaluar la actividad del coagulante de NovoSeven® y de CB553 en ratones de FVIIF$^{-/-}$ al 0.3, 1, 3 y 6 mg/kg fueron realizados. En el experimento de NovoSeven®, la pérdida de sangre en el grupo del vehículo fue de 912.79 ± 38.32 µL, el cual fue reducido perceptiblemente por el tratamiento de NovoSeven® en 6 y 3 mg/kg (a 361.74

353

352

± 55.28 µL y 586.98 ± 60.56 µL; $p < 0.05$ Kruskal-Wallis seguido por la posprueba de Dunn). Reduciendo la dosis a 1 mg/kg resultó en la pérdida de sangre de 674.84 ± 46.88 µL y en la dosis ensayada más baja el valor fue de 801.08 ± 41.39 µL. En el experimento CB553, el grupo del control de vehículo produjo la pérdida de sangre de 904.08 ± 15.38 µL. Esto fue reducido perceptiblemente ($p < 0.05$ Kruskal-Wallis seguido por la posprueba de Dunn) por CB553 en 6 mg/kg a 451.04 ± 74.17 µL. Reduciendo la dosis a 3 mg/kg produjo un valor de la pérdida de sangre de 695.75 ± 60.50 µL mientras se bajaba la dosis adicionalmente a 1 y 0.3 mg/kg, resultó en los valores de la pérdida de sangre próximos y en los niveles del control del vehículo (846.08 ± 34.17 µL y 936.43 ± 31.39 µL, respectivamente).

Ejemplo 15

La determinación del factor VIIa que unía el factor del tejido soluble

La capacidad de las variantes de FVIIa expresadas en las células de HEK 293 o en las células de BHK, para unir el factor del tejido soluble (sTF), fue evaluada usando resonancia del plasmón de superficie de Biacore. Las variantes de FVIIa son evaluadas a través de la medición de la unión del perfil, en tres concentraciones de la proteasa de dos experimentos duplicados, usando dos diferentes niveles de sTF unidos a un chip de Biacore CM5.

Una nueva Serie S CM5 chip sensorial (GE Healthcare Cat #BR 1006-68) fue acoplado albúmina de suero bovino y con factor del tejido soluble, usando un instrumento de Biacore T100. El acoplamiento fue efectuado con el tapón de acoplamiento de Biacore (30 mM Na Hepes pH 7.4, 135 mM NaCl, de

354
353

1 mM EDTA, 0.01% Tween-20) con un Estuche de Acoplamiento de Amina (GE Healthcare Cat #BR 1000-50) y el asistente del protocolo en el programa de Biacore T100. Para la inmovilización, las cuatro células del chip fueron utilizadas. Las células 1 y 3 fueron acopladas con 500 unidades de respuesta (RU) de la proteína de referencia de la albúmina de suero bovino, diluida en el tapón de acetato, pH 4.0; y las células 2 y 4 fueron acopladas con 500 y 250 RU de sTF (sistemas del R&D) diluidos en el tapón de acetato, pH 4.5.

Cada variante de FVIIa, y la proteasa del tipo-salvaje de FVIIa, fueron probadas en tres concentraciones y en duplicado. Las proteasas fueron diluidas a 60 nM, a 30 nM y a 15 nM en un tapón de ensayo de Biacore de 100 µL (200 mM Na Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM de $CaCl_2$, 0.1% PEG 8000, 0.1% BSA, 0.01% Tween-20) en una placa de 96 pozos de ensayo. El ensayo: cada muestra fue ensayada en el instrumento de Biacore T100, usando 120 segundos de tiempo de contacto, seguidos por 180 segundos de tiempo de disociación en un caudal de 10 µL./min. Un tapón en blanco también fue ensayado. El chip fue regenerado con el EDTA de 50 mM, pH 7.0 por 60 segundos y después 30 segundos. El ensayo para medir la unión del tipo-salvaje de FVIIa al sTF debe ceder tres grupos de curvas con un índice de K_d de aproximadamente 8 nM.

El programa de la evaluación de Biacore T100 fue utilizado para analizar los datos. Específicamente, la Cinética/Afinidad 1:1 Análisis de Unión, el cual ajusta los datos a la isoterma de Langmuir, era utilizada y los datos fueron ajustados individualmente por dos réplicas de cada variante en dos

acoplamientos de la unidad de la respuesta. Los cuatro ajustes de valores de K_d fueron promediados y presentados en la tabla 22. Los polipéptidos de FVIIa que contenían la mutación de M156Q tendieron para tener resultados más bajos de K_d y así unirse más firmemente al sTF.

Tabla 22. La unión de las variantes de FVIIa al soluble TF

ID	Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Afinidad Kd (nM)	
			HEK 293	BHK
CB553	WT	WT	7.9	9.0
CB592	M298Q	M156Q	3.9	
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	8.0	
CB669	V158D/G237V/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q/G97V	14.9	
CB690	K197E/G237V/M298Q	K60aE/G97V/M156Q	4.8	
CB691	K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	6.6	
CB692	K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	5.9	
CB693	K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/K60cE/G97V/M156Q/K192Q	6.4	
CB695	G237V/M298Q	G97V/M156Q	3.8	
CB696	G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	2.5	
CB946	M298Q/K341D	M156Q/K192D	7.9	

Ejemplo 16

Resonancia del plasmón de la superficie (SPR) examinando las variantes de FVIIa para la resistencia a TFPI

La resistencia relativa de las diferentes variantes de FVIIa a la inhibición por el soluble recombinante humano TFPI, fue evaluado usando un ensayo del alto-rendimiento de la resonancia del plasmón de la superficie (SPR) con el instrumento de Biacore T100. La resistencia relativa de las variantes de FVIIa

a la inhibición por TFPI fue evaluada por la medición de la cantidad relativa de variante de FVIIa unida al soluble TFPI, inmovilizado en un chip sensorial Biacore CM5, comparado a la cantidad del tipo-salvaje de FVIIa unido posterior a la estandarización del tiempo de inyección y de la concentración de proteasa.

Para cada experimento, TFPI soluble (sistemas del R&D) fue inmovilizado a un nuevo chip Biacore CM5 series S sensorial de 4 células de flujo de (GE Healthcare), que usaba el protocolo de acoplamiento de la amina disponible dentro del programa del control de Biacore T-100 (GE Healthcare), y de los reaccionantes proporcionados con el Estuche de Acoplamiento de Amina (GE Healthcare). Las cuatro células de flujo disponibles eran utilizadas para la inmovilización de dos diferentes densidades de TFPI y de la albúmina de suero bovino (BSA), que sirvieron como agente de bloqueo en las células de la referencia. BSA fue diluido a 5 µg/ml en el acetato de sodio (pH 4.0) e inmovilizado en las células de flujo 1 y 3 a 1000 y 2000 unidades de respuesta (RU), respectivamente. Para la inmovilización de TFPI, el soluble liofilizado TFPI (10 µg) era resuspendido en 100 µL 1X del tapón de acoplamiento (30 mM Hepes, 135 mM de NaCl, 1 mM EDTA, 0.01% Tween-20, pH 7.4) a una concentración de 0.1 mg/mL. Un total de 20 µL de 0.1 mg/ml TFPI, según lo diluido a 10 µg/ml en el pH 4.0 del acetato de sodio para la inmovilización de las células de flujo 2 y 4 a 1000 y 2000 RU, respectivamente. El tapón de acoplamiento fue utilizado como el tapón de funcionamiento durante las etapas de la inmovilización.

357

Cada muestra de FVIIa fue preparada a una concentración final de 320 nM en 1X tapón de funcionamiento (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM $CaC1_2$, 0.1% PEG 8000, 0.1% BSA, 0.01% Tween-20, pH 7.4) conteniendo el sTF de 620 nM (Factor de Coagulación Humana III; Sistemas de R&D). Generalmente, cada variante de FVIIa fue diluida diez veces en 1X tapón de funcionamiento antes de la dilución final de 320 nM. Los complejos de FVIIa/sTF fueron preparados a un volumen final de 120 µL en duplicado, que permitían hasta 48 variantes únicas de FVIIa para ser cargados en una placa de almacenamiento de 96 pozos y evaluados con las inyecciones duplicadas en una sola operación. El complejo de FVIIa/sTF fue incubado a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos, antes de la iniciación de la primera inyección de la muestra.

Un método de análisis obligatorio normalizado fue creado dentro del Programa de Control de Biacore (GE Healthcare) en el cual cada replica de FVIIa se inyecta por 180 segundos de tiempo asociado, seguidos por 60 segundos cortos de disociación, a un caudal de 10 µL./min. La regeneración del chip sensorial siguió a la fase de la disociación, por 30 segundos con 10 mM glicina, 500 mM NaCl, pH 3.0 y después de un período de 60 segundos de estabilización con 1X tapón de funcionamiento a los mismos 10 µL./min. de caudal. Dos puntos de referencia del ensayo fueron registrados para cada operación y el análisis subsiguiente de los datos, una de 5 segundos antes de la conclusión de la fase de la asociación (unión) y otra de 5 segundos informados antes de la conclusión de la fase de la disociación (disociación).

Antes de iniciar un ensayo completo, el chip sensorial fue ensayado con una sola inyección del tipo-salvaje FVIIa/sTF de 320 nM por 180 segundos, que deben dar una respuesta de aproximadamente 400-450 RU y 750-850 RU para unir a las células de flujo 2 (RU 1000) y 4 (200 RU), respectivamente.

El análisis de los datos fue realizado primero con el Programa de Evaluación de Biacore T100 (GE Healthcare), para inspeccionar los parámetros de la validación del ensayo, los cuales incluyen la verificación de que la unión a la célula de referencia es minima, la derivación de la línea de base y el control de la unión de las inyecciones en blanco (tapón del funcionamiento). Las tablas de los datos fueron generadas dentro de esta aplicación, que indican la cantidad de variante unida de FVIIa (en RU) en ambos, la unión del punto del informe y la disociación del punto del informe. Los datos de las tablas fueron exportados posteriormente para el análisis adicional, dentro del ambiente de la hoja de cálculo Microsoft Excel. Los puntos de datos primos (RU unidos) fueron corregidos para el control de unión del chip sensorial; y después una relación de la cantidad de tipo-salvaje de FVIIa unida (en RU) con la cantidad de variante de unión de FVIIa fue tomada para cada parámetro e informada como Unida (wt/variante) y Disociación (wt/variante). La resistencia a la inhibición de TFPI se refleja como un aumento de la relación de uno o ambos parámetros evaluados. Por ejemplo, un valor de 20 de Unión (wt/variante) o de Disociación (wt/variante) para una variante concreta de FVIIa, indica que la variante es 20-veces más resistente a la inhibición de TFPI, que la de tipo-salvaje de FVIIa. Las distintas variantes exhibieron resistencia creciente a la

359

358

inhibición de TFPI. Por ejemplo, CB609, CB637, CB691, CB856 y CB857 están entre el grupo que exhibió de 20 a 60-veces resistencia y las variantes que contenían el K341D por la numeración de FVII maduro (correspondiente por a la numeración de la quimotripsina) por ejemplo CB735, tiene relaciones indicando resistencia significativa a TFPI (mayor que 50 -150-veces) y las variantes que contienen la mutación 9CB945 de K192D) tiene una relación indicando resistencia significativa a TFPI (mayor que 40 -150-veces). En algunos casos, la velocidad de disociación era más afectada que la velocidad de asociación. Algunos ejemplos de las variantes que exhibieron este perfil son CB735, CB854, CB855, CB856 y CB857.

Tabla 23. Resistencia de las variantes de FVIIa a la inhibición por TFPI

ID	Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	TF-Dependiente TFPI Ensayo de Resistencia			
			Células 293-F		Células BHK-21	
			Unión (wt/variante)	Disociación (wt/variante)	Unión (wt/variante)	Disociación (wt/variante)
CB553	WT	WT	1.0	1.0	1.0	1.0
CB558	K197A	K60aE	1.4	1.3		
CB563	K197E	K60cE	1.4	1.4		
CB592	M298Q	M156Q	1.9	1.8		
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	0.8	0.8	1.0	1.0
CB608	G237V	G97V	2.2	1.8		
CB609	K341Q	K192Q	13.0	19.7		
CB637	K197E/K341Q	K60aE/K192Q	67.2	171.1		
CB670	G237V/K341Q	K192Q/G97V	12.8	12.4		
CB671	K197V/G237V/K341Q	K60aE/K192Q/G97V	18.9	21.8		
CB688	K197E/K199E	K60aE/K60cE	2.2	2.1		

CB689	K197E/G237V	K60aE/G97V	1.8	1.6		
CB691	K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	33.9	68.1		
CB692	K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	15.9	21.5		
CB693	K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/K60cE/G97V/M156Q/K192Q	23.4	43.5		
CB694	K199E/K341Q	K60cE/K192Q	18.8	30.7		
CB695	G237V/M298Q	G97V/M156Q	0.9	0.8		
CB696	G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	4.5	6.0		
CB697	R290N	R147N	1.6	1.5		
CB698	R290Q	R147Q	1.3	1.2		
CB699	R290K	R147K	0.7	0.7		
CB700	R290M	R147M	1.1	1.1		
CB701	R290V	R147V	2.6	2.7		
CB733	K341N	K192N	11.3	63.8		
CB734	K341M	K192M	4.9	5.4		
CB735	K341D	K192D	185.6	380.7		
CB853	G237T238insA	G97T98insA			6.5	18.2
CB854	G237T238insS	G97T98insS			5.2	13.0
CB855	G237T238insV	G97T98insV			7.3	16.8
CB856	G237T238insAS	G97T98insAS			22.8	154.5
CB857	G237T238insSA	G97T98insSA			21.5	146.5
CB858	D196K197insK	D60K60ainsK			1.0	0.8
CB859	D196K197insR	D60K60ainsR			0.5	0.5
CB862	D196K197insA	D60K60ainsA			0.5	0.4
CB863	D196K197insM	D60K60ainsM			0.4	0.4
CB864	K197I198insE	K60aI60binsE			1.3	1.1
CB865	K197I198insY	K60aI60binsY			1.1	1.0
CB867	K197I198insS	K60aI60binsS			0.7	0.6
CB902	K197E/M298Q	K60aE/M156Q	2.6	2.3		
CB945	M298Q/K341D	M156Q/K192D	146.8	196.5		

Ejemplo 17

Determinación de Concentración de Proteasa Catalítica Activa usando el Sitio Activo Valorante 4-metilumbeliferil *p'* - guanidinobenzoato (MUGB)

La concentración catalíticamente activa de FVIIa en una solución de reserva fue determinada valorando un complejo de FVIIa y un factor de tejido soluble (sTF) con 4-metilumbeliferil *p'* - guanidinobenzoato (MUGB), un sustrato fluorogénico del éster desarrollado como sitio activo para las cuasi-tripsina serina proteasa. El ensayo fue realizado esencialmente como descrito por Payne et al. (Bioquímica (1996) 35:7100-7106) con algunas pequeñas

361

860

modificaciones. MUGB reacciona fácilmente con FVIIa, pero no FVII o la proteasa inactiva, para formar un efectivamente estable Acilo-enzima intermedia bajo las condiciones en las cuales la concentración de MUGB está saturada, y la desacilación es especialmente lenta y la velocidad se limita para la catálisis. Bajo estas condiciones, la proteasa de FVIIa experimenta un solo recambio catalítico para liberar el 4-metilumbeliferona fluoróforo (4-MU). Cuando el estallido inicial de la fluorescencia se calibra a un patrón externa de concentración de una curva estándar de fluorescencia 4-MU, la concentración de sitios activos puede ser calculada.

Los ensayos fueron realizados con 2 mL de volumen de reacción en una cubeta de cuarzo de 1 cm x 1 cm bajo continua agitación. Cada reacción contuvo 0.5 μM sTF (Sistemas Humanos de R&D) en un tapón de ensayo que contenía 50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$ y 0.1% PEG 8000, PH 7.6. La solución estándar de 4-MU era recién preparada en una concentración de reserva de 0.5 M en DMSO y la concentración confirmada por espectroscopía de la absorbancia a 360 nm, usando un coeficiente de extinción de 19.000 M-1 cm-1 m- en 50 mM tapón Tri, pH 9.0. MUGB fue preparado en una concentración de reserva de 0.04 M en DMSO basado en el peso seco. Los ensayos fueron iniciados añadiendo 4 μL de 4 mM MUGB (8 μM de concentración final) a una solución de 0.5 μM sTF (20.2 μL de 49.4 μM sTF) en tapón de ensayo de 1x y primero midiendo el antecedente de la hidrólisis de MUGB por ~150-200 segundos antes de la adición de FVIIa o de FVIIa variante a una concentración final de ~100-200 nM basado en el inicial de ELISA

362

(Ejemplo 2C.1) o la valoración del sitio activo con FFR-CMK (Ejemplo 6). La liberación de la fluorescencia 4-MU en la fase de ráfaga de la reacción, fue seguida por 1000-1200 segundos adicionales. Una curva estándar libre de 4-MU fue preparada por la valoración de la absorbancia-calibrada de 4-MU en tapón de ensayo de 1x que contenía 0.5 μM sTF en 20 nM pasos para una concentración final de 250 nM.

Para el análisis de los datos, las huellas de la reacción fueron importadas al paquete del programa Graphpad Prisma y la contribución del antecedente de la hidrólisis fue restada de la curva por la extrapolación de la velocidad inicial medida por hidrólisis espontánea de MUGB, que era típicamente más pequeña que el 5% de la ráfaga de la fluorescencia total. La curva corregida fue ajustada a una sola ecuación exponencial con un componente lineal (para tomar en cuenta la velocidad lenta de la desacilación) de la forma Δ fluorescencia = Amp $(1-e^{-kt})+Bt$, donde Amp = la amplitud de la fase de la ráfaga bajo la saturación de las condiciones del ensayo descritas arriba, *k* es la constante de velocidad de primer orden para la formación de la Acilo-enzima y B es una mayor tasa constante de velocidad aparente asociado con la rotación completa de MUGB. La concentración de proteasa activa de FVIIa es calculada por la comparación del ajuste del parámetro por amplitud de la curva estándar 4-MU. Los valores de múltiples ensayos fueron medidos, promediados y las desviaciones estándar determinadas.

Debido a que las modificaciones serán evidentes para aquellos especialistas en esta técnica, está destinado que esta invención sea limitada solamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

364

363

REIVINDICACIONES:

1. Un polipéptido (FVII) del factor VII modificado FVII), que comprende:

un dominio heterólogo Gla, o una parte contigua del mismo suficiente para efectuar la unión de fosfolípidos, en el que:

el polipéptido FVII modificado tiene actividad procoagulante;

el dominio heterólogo Gla se selecciona de entre un dominio Gla en el Factor X (FX), protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína Gla de la matriz, la proteína 6 específica de detención del crecimiento (Gas6) y la proteína Z; y

la parte suficiente es de 30 o más aminoácidos contiguos desde el dominio Gla heterólogo, mediante el cual se aumenta la unión de los fosfolípidos al polipéptido FVII en comparación con el polipéptido FVII con el dominio Gla nativo.

2. Un polipéptido FVII modificado, que comprende:

un dominio heterólogo Gla, o una parte contigua del mismo suficiente para efectuar la unión de fosfolípidos, en el que:

el dominio heterólogo Gla se selecciona de entre un dominio Gla en el Factor IX (FIX), factor X (FX), protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína Gla de la matriz, la proteína 6 específica de detención del crecimiento (Gas6) y la proteína Z;

el polipéptido FVII modificado tiene actividad procoagulante;

la parte suficiente es 30 o más aminoácidos contiguos desde el dominio Gla heterólogo, mediante el cual se altera la unión de los fosfolípidos al polipéptido FVII en comparación con el polipéptido FVII con el dominio Gla nativo, y

el polipéptido FVII modificado comprende una o más modificaciones de aminoácidos adicional(es), en el que las modificaciones se seleccionan de entre inserciones de aminoácidos, supresiones y sustituciones que dan como resultado

un aumento de la resistencia a la antitrombina-III (AT- III), aumento de la unión y/o afinidad con los fosfolípidos, aumento de la afinidad por el factor tisular (TF), aumento de la actividad intrínseca, aumento de la actividad catalítica o coagulante TF-dependiente, aumento de la actividad coagulante, alteración de la conformación del polipéptido para alterar la cimogenicidad, aumento de la actividad catalítica o coagulante mediante el desplazamiento del equilibrio entre conformaciones FVIIa altamente activas y menos activas a favor de las conformaciones altamente activas, aumento de la resistencia a las proteasas, disminución de la glicosilación, aumento de glicosilación, reducción de la inmunogenicidad, aumento de la estabilidad, y/o facilita el enlace con un grupo químico.

3. El Polipéptido FVII modificado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el dominio heterólogo Gla tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 110-118, 120 y 121, o una parte suficiente de la misma para efectuar la unión a fosfolípidos.

4. El Polipéptido FVII modificado de la reivindicación 1, que comprende una modificación seleccionada de entre Gla intercambiado por FX, Gla Intercambiado por Prot C, Gla Intercambiado por Prot S y Gla Intercambiado por trombina.

5. El Polipéptido FVII modificado de la reivindicación 2, que comprende una modificación seleccionada de entre Gla Intercambiado por FIX, Gla Intercambiado por FX, Gla Intercambiado por Prot C, Gla Intercambiado por Prot S y Gla Intercambio por trombina .

6. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que contiene hasta 7 aminoácidos reemplazados.

7. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 , en el que el polipéptido FVII modificado comprende una o más modificaciones de aminoácidos(s) en las posiciones correspondientes a una o más de G237, T239, R290, K341 y en una Polipéptido FVII que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NOS: 3 .

8. El polipéptido de FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 , en el que el polipéptido FVII modificado comprende una o más modificaciones de aminoácidos(s) que corresponden a modificaciones seleccionadas de entre G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341E, K341R, K341N, K341M, K341D, K341Q, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA y K197I198insS en SEQ ID NO : 3 .

9. Un polipéptido de FVII modificado, que comprende un fragmento de un polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 , en el que el fragmento tiene actividad coagulante y comprende el dominio heterólogo Gla.

10. Un polipéptido (FVII) del factor VII modificado o un fragmento del mismo que tiene actividad coagulante, que comprende una modificación en un polipéptido de FVI, en el que la modificación se selecciona de entre las modificaciones de aminoácidos correspondientes a G237W, G237I, G237V, R290M, R290V, K341M, K341D, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY,

K197I198insA o K197I198insS en un polipéptido de FVII que tiene una Secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3, en el que el fragmento activo comprende una o más de las modificaciones de aminoácido.

11. El polipéptido FVII modificado de la reivindicación 10, en el que el polipéptido de FVII comprende una modificación adicional que es un aminoácido de sustitución o inserción en una posición correspondiente a una posición seleccionada de entre G237, T239, R290 y K341, en el que la primera modificación y la segunda modificación son en diferentes aminoácidos.

12. El Polipéptido FVII modificado de la reivindicación 11, en el que la modificación adicional de aminoácido se selecciona de entre un reemplazo correspondiente a G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341E, K341R, K341N, K341M, K341D, y K341Q.

13. Un polipéptido (FVII) del factor VII modificado o un fragmento activo del mismo, que comprende dos o más modificaciones en un polipéptido de FVII, en los que:
las dos o más modificaciones de aminoácidos se seleccionan de entre modificaciones de aminoácidos correspondientes a G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341E, K341R, K341N, K341M, K341D, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA o K197I198insS en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 , en el que el fragmento activo tiene actividad coagulante y comprende al menos dos de las modificaciones de aminoácidos.

14. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el polipéptido de FVII contiene hasta 7 modificaciones.

15. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 , que comprende una modificación de aminoácido(s) en posiciones correspondientes a una o más de Q176, M298 y E296 en un polipéptido de FVII que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 .

16. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende una modificación de aminoácidos en una posición correspondiente a M298 en un polipéptido FVII que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3.

17. El Polipéptido FVII modificado de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en el que la modificación de aminoácido(s) ocurre en las posiciones correspondientes a una o más de Q176, M298 o E296 se seleccionan de entre Q176A, M298Q, E296V y E296A.

18. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, que comprende modificaciones de aminoácidos seleccionados de entre V158D/G237V/E296V/M298Q, G237V/M298Q, G237V/M298Q/K341Q, M298Q/Gla intercambiado por FIX y M298Q/K341D.

19. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que el polipéptido FVII no modificado comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-3 y 18-74.

20. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que el polipéptido FVII no modificado tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NOS°: 1 - 3.

21. El polipéptido FVII de cualquiera de las reivindicaciones 1-20 en el que el polipéptido FVII no modificado tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3.

22. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEQ ID NOS: 236-240 y 247, o un fragmento activo del mismo que tiene actividad coagulante.

23. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de los SEQ ID NOS: 236-240 y 247, o un fragmento activo del mismo que tiene actividad coagulante.

24. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-23 que es modificado post-traduccionalmente.

25. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en el que el polipéptido FVII esta glicosilado, carboxilado, hidroxilado, sulfatado, fosforilado, albuminado, o conjugado con un parte de polietileno glicol (PEG).

26. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-24 que es un polipéptido de dos cadenas.

27. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-24 que es polipéptido (FVIIa) del Factor VII activado de dos cadenas que se escinde entre los residuos correspondientes a la arginina en la posición 152 y la isoleucina en la posición 153 de la SEQ ID NO: 3 .

28. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-24 que esta activado.

29. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-24 que es un polipéptido de cadena única.

30. Una molécula de ácido nucléico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-29, en donde:
la Secuencia de la molécula de ácido nucléico no modificado comprende la secuencia de nucleótidos establecidas en SEQ ID NO: 108 o SEQ ID NO: 109 o degeneradas del mismo o una parte del mismo que codifica el polipéptido FVII de la SEQ ID NO: 3 o un fragmento activo del mismo.

31. Un vector que comprende la molécula de ácido nucléico de la reivindicación 30, en el que el vector se selecciona de entre pCMV, pQE 32, pQE 30, pQE 31, pET 11a, 12a- c PET, PET y PET 15b 19b.

32. Una célula, que comprende el vector de la reivindicación 31, en la que la célula se selecciona de entre las células de riñón de cría de hámster (BHK - 21), células 293, células CHO, células *Pichia sp.*, y células de *Pichia pastoris*.

377

370

33. Una célula, que comprende el vector de la reivindicación 31, en donde la célula se selecciona de entre las células de E. coli, células de *Saccharomyces cerevisiae,* células *de Drosophila,* células *de lepidópteros,* células *de Schizosaccharomyces pombe,* células *de Yarrowia lipolytica,* células *de Kluyveromyces lactis,* células *Pichia sp.,* células *de Pichia pastoris,* células *Sf9,* células *Pseudaletia unipuncta (A7S),* células *Danaus plexippus* (Dpn1), Schnieder 2 (S2), células Kc, células C7, células Balb/3T3, células HeLa, células MT2, células de ratón NS0 (no secretoras), células Sp2/0, células COS, células NIH3T3, células 2B8, células HKB y células EBNA - 1 libres de suero.

34. Una composición farmacéutica, que comprende una concentración terapéuticamente efectiva o cantidad de un polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-29, o una molécula de ácido nucléico de la reivindicación 30 o un vector de la reivindicación 31 o una célula de la reivindicación 32 o la reivindicación 33, en un vehículo farmacéuticamente aceptable .

35. La composición farmacéutica de la reivindicación 34 que se formula para la administración local, sistémica o tópica.

36. La composición farmacéutica de la reivindicación 34 o la reivindicación 35 que se formula para la administración oral, nasal, pulmonar, bucal, transdérmica, subcutánea, intraduodenal, enteral, parenteral, intravenosa, o intramuscular.

37. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 34-36 que se formula para liberación controlada.

372

371

38. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 34-36 que se formula para administración en una sola dosis.

RESUMEN

Se suministran polipéptidos de factor VII modificados y usos de los mismos. Dichos polipéptidos FVII modificados incluyen Factor VIIa y otras formas del Factor VII. Entre los polipéptidos FVII suministrados se encuentran aquellos que tienen actividades alteradas, típicamente actividad procoagulante alterada, incluyendo actividades procoagulante aumentadas. Así, dichos polipéptidos modificados son terapéuticos.

379
373 10

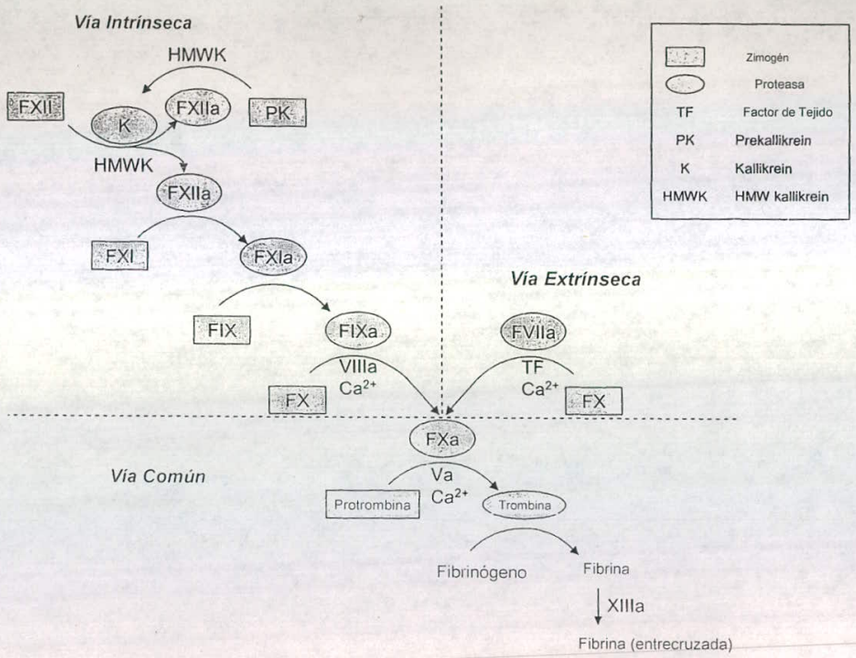


Figura 1. Cascada de Coagulación

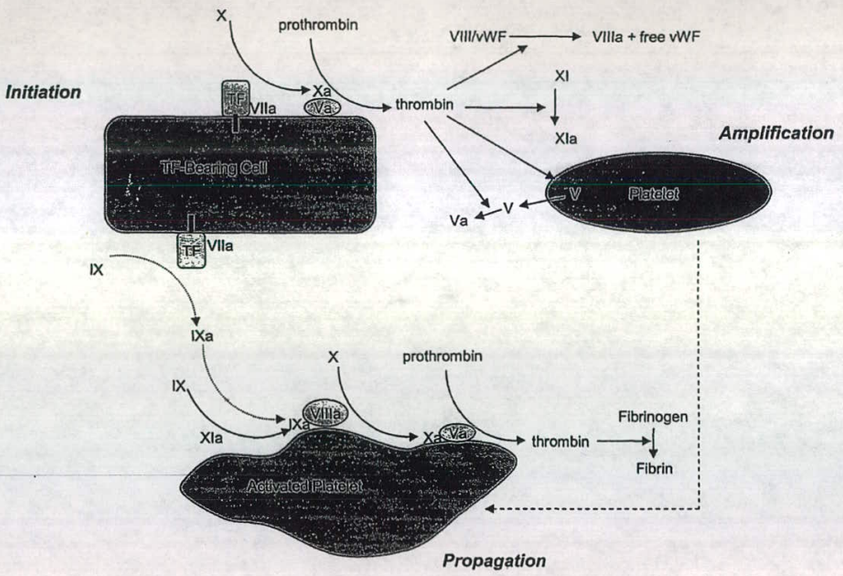


Figure 2. Cell-based model of coagulation

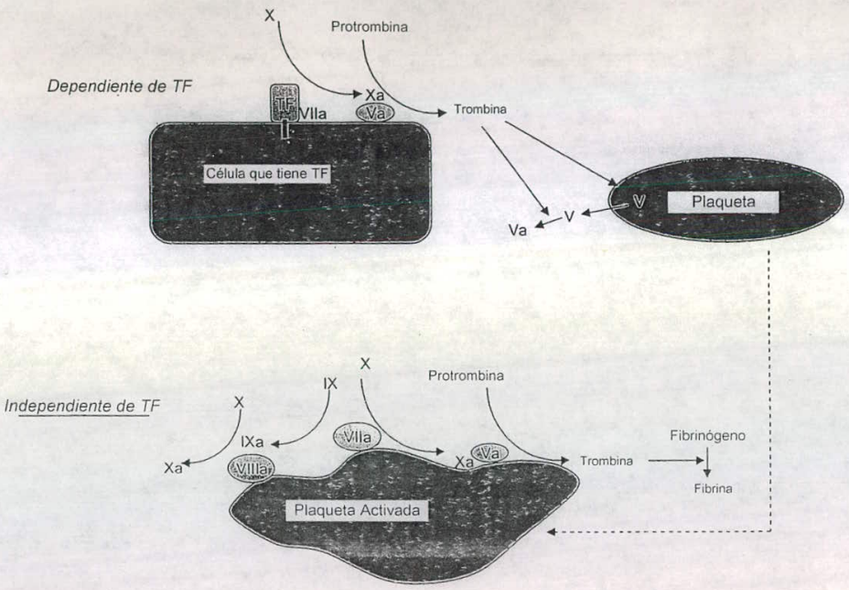
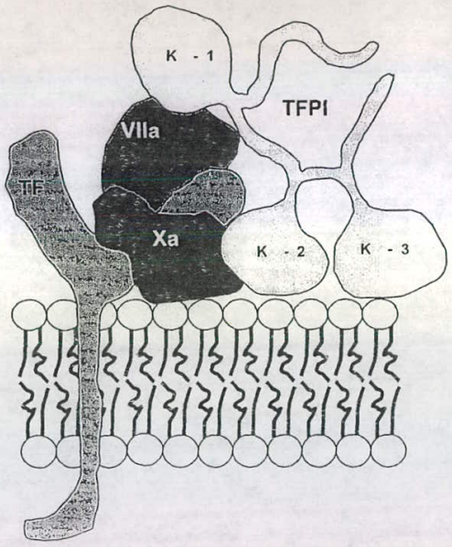


Figura 3. Iniciación de FVII dependiente de TF e independiente de TF de producción de trombina



(Adaptado de : sanquinbblh.nl/sanquin-eng/sqn_reagents.nsf/0/6dbd8d7ab5a0a4a5c1256f8c00540777/$FILE/highlight%20TFPI.doc

Figura 4. Representación de la unión de TFPI a FVIIa

(a)

```
                (1) 1          10         20         30         40          55
BPTI 5L15       (1) APDFCLEPPYDGPCRALHLRYFYNAKAGLCQTFVYGGCLAKRNNFESAEDCMRTC
TFPI-2 Kunitz 1 (1) ----CLLPLDYGPCRALLLRYFYDRYTQSCRQFLYGGCEGNANNFYTWEACDDAC
Consensus       (1)     CL P   GPCRAL LRYFY      C  F YGGC A  NNF S E C   C
```

(b)

```
                (1) 1          10         20         30         40          51
TFPI-1 Kunitz 1 (1) CAFKADDGPCKAIMKRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMC
TFPI-2 Kunitz 1 (1) CLLPLDYGPCRALLLRWYMDRYTQSCRQFLYGGCEGNANNFYTWEACDDAC
Consensus       (1) C    D GPCKAIL RFFF  FT  C  FIYGGCEGN N F S E C   C
```

Figure 5. Primary sequence alignment of the first Kunitz domain of TFPI-2 with BPTI^{5L15} and TFPI-1

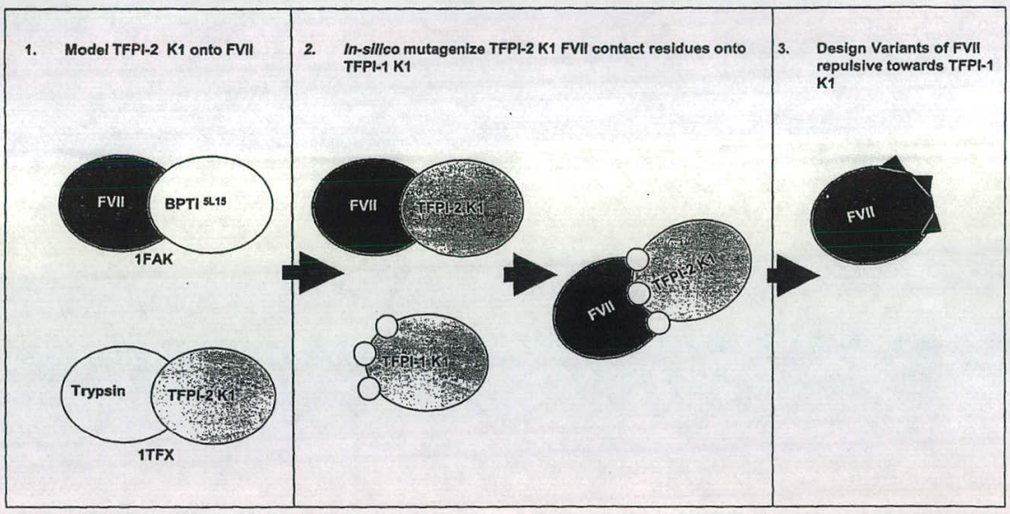


Figure 6. Homology Model

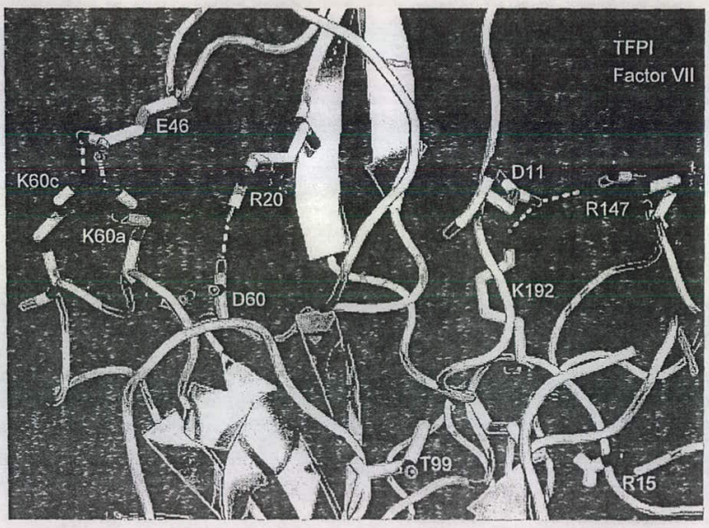


Figura 7. Residuos de contacto de Factor VII y TFPI

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Catalyst Biosciences, Inc.
Edwin Madison
Christopher Thanos
Sandra Waugh Ruggles
Shaun Coughlin

<120> POLIPEPTIDOS FACTOR VII MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 119357-00067/4913PC

<140> No asignado aún
<141> Adjunto

<150> 60/923,512
<151> 2004-04-13

<160> 250

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Isoforma a de precursor de 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
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 de 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 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
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

<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
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 de 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
                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 de 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
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 de Factor VII

<220>
<221> INSEGURO
<222> (0)...(0)
<223> Xaa podría 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
            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> Pan troglodytes

<220>
<223> Precursor de Factor VII

<220>
<221> INSEGURO
<222> (0)...(0)
<223> Xaa podría 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
```

389

388

```
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
            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

390
389

<213> Oryctolagus cuniculus

<220>
<223> Precursor de 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
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
```

391

390

```
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 de 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
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
```

392
391

```
                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 de 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
            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 de Factor VII (isoforma b)

<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>
<223> Precursor de 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 de Factor VII

<400> 13
Met Ser Leu Leu Leu Val Phe Ser Val Leu Trp Ser Leu His Tyr Cys

390

395

```
 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
```

397

~~396~~ 410

<210> 14
<211> 441
<212> PRT
<213> Fugu rubripes

<220>
<223> Precursor de 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
```

360

397

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
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<220>
<223> Precursor de 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

399

398

```
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
<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
```

400

399

```
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
<212> PRT
<213> Gorilla gorilla

<220>
<223> Factor VII (fragmento)

<220>
<221> INSEGURO
<222> (0)...(0)
<223> Xaa podría 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> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> variante D60K de factor VIIa

<400> 18
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 Lys 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
```

402

401

```
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> 19
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60R de Factor VIIa

```
<400> 19
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 Arg 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> 20
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60A de Factor VIIa

<400> 20
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

404

~~403~~ 404

```
            180                 185                 190
His Cys Phe Ala 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> 21
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K60aY de Factor VIIa

<400> 21

```
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
```

405
404
~~412~~

```
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 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 Tyr 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> 22
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K60aA de Factor VIIa

<400> 22

```
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
```

406
405

```
            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 Ala 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> 23
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K60aE de Factor VIIa

<400> 23

```
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 Glu 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> 24
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K60aD de Factor VIIa

<400> 24

```
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 Asp 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> 25
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K60aL de Factor VIIa

<400> 25

```
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 Leu 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> 26
<211> 406

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K60aM de Factor VIIa

<400> 26

```
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 Met 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> 27
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K60cA de Factor VIIa

<400> 27
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 Ala 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> 28
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K60cD de Factor VIIa

<400> 28

```
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 Asp 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
```

4/13
412
426

```
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> 29
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K60cE de Factor VIIa

<400> 29

```
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 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> 30
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante T99A de Factor VIIa

<400> 30

```
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
```

415
414

Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Ala 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> 31
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante R147A de Factor VIIa

<400> 31
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

9/15
415
429

```
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> 32
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante R147E de Factor VIIa

<400> 32

```
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
```

4/2
416
400

```
    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 Glu 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> 33
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante R147D de Factor VIIa

<400> 33

```
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 Asp 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> 34
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K192E de Factor VIIa

<400> 34

```
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 Glu 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> 35
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K192R de Factor VIIa

<400> 35

420

```
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 Arg 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> 36
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60R/R147E de Factor VIIa

<400> 36

```
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 Arg 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 Glu 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> 37
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60K/R147E de Factor VIIa

<400> 37

```
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 Lys 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 Glu 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> 38
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60R/R147D de Factor VIIa

<400> 38

```
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 Arg 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 Asp 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> 39
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60R/K60aE/K60cE de Factor VIIa

<400> 39

```
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 Arg Glu 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 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> 40
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60K/K60aE/K60cE de Factor VIIa

<400> 40

```
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 Lys 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
```

426
425

```
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> 41
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60R/K60aE/K60cE/R147E de Factor VIIa

<400> 41

```
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 Arg Glu 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 Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Glu 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> 42
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60R/K60aM/K60cE de Factor VIIa

<400> 42

```
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 Arg Met 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 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> 43
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60R/K60aM/K60cE/R147E de Factor VIIa

<400> 43

```
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
```

429

```
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 Arg Met 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 Gln Leu Leu
        275                 280                 285
Asp Glu 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> 44
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante L13P de FVII

<400> 44

```
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
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> 45
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor F64L)

<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 Leu
    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
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> 46
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor L73Q)

<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 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> 47
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor E79Q)

<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 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> 48
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor S120P)

<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 Pro Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
115 120 125

435
439

```
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> 49
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor C121F)

<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
```

436
435

```
                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
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
```

632
A36 ITO

<210> 50
<211> 466
<212> PRT
<213> Hmo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor L125P)

<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 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
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 de FVII (precursorY128C)

<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 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
```

939
938

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> 52
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor R139K)

<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
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
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> 53
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor R139Q)

<400> 53

```
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
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> 54
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor R139W)

<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 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
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
```

443
~~442~~ 466

```
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> 55
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor C151S)

<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 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> 56
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor E154K)

<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 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> 57
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor G157C)

<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 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
```

447
~~446~~ ~~450~~

<210> 58
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursorG157S)

<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 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> 59
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursorG157V)

<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 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
```

<210> 60
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor Q160R)

<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 Arg
145                 150                 155                 160
Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
                165                 170                 175
```

450

```
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> 61
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor P194T)

<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
```

457

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
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 de FVII (precursor C195R)

<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 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
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
```

453
452

```
            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 de FVII (precursor K197E)

<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
            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
```

454
~~453~~ 454
~~472~~

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> 64
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor R212Q)

<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

455
484
438

```
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
        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> 65
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor G216D)

<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 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
```

456
455
429

```
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
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> 66
<211> 466
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor C238Y)

<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 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 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
```

458

```
            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 de FVII (precursor T241N)

<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
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
```

459
458

```
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> 68
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor C254Y)

<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
```

460
459

```
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> 69
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor A266T)


<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
```

460 461

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> 70
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

462
461

<220>
<223> Variante de FVII (precursor R283W)

<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
            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
```

463
462

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> 71
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor V295D)

<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
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
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 de FVII (precursor D302H)

<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
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

465
464

```
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
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> 73
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor D302N)

<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
    50                  55                  60
Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
```

466 466

```
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
            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> 74
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

~~466~~ 467

<220>
<223> Variante de FVII (precursor A304T)

<400> 74

```
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 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> 75
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor A304V)

<400> 75

```
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
```

469
468
465

```
     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> 76
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor R307C)

<400> 76

```
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
```

470
469

```
                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> 77
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor R307H)

<400> 77

```
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
```

471
~~470~~ 469

```
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> 78
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor V312M)

<400> 78

```
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 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> 79
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor E325K)

<400> 79

```
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 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> 80
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor T332M)

<400> 80

```
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
```

<210> 81
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor V341F)

<400> 81

```
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
```

92
473

```
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
            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> 82
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

472
476

<220>
<223> Variante de FVII (precursor A352T)

<400> 82

```
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
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> 83
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor A354V)

<400> 83

```
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 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> 84
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor M358I)

<400> 84
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 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> 85
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor M358V)

<400> 85

```
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 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> 86
<211> 466
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor P363R)

<400> 86

```
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 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> 87
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor R364Q)

<400> 87

```
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
```

484
483

```
     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> 88
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor T367S)

<400> 88

```
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 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> 89
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor C370F)

<400> 89

```
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
```

486
485

```
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> 90
<211> 466

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor C389G)

<400> 90
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

<210> 91
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor G391S)

<400> 91
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

409
488

```
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
Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro
    450                 455                 460
Phe Pro
465
```

<210> 92
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor G402E)

<400> 92

```
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
```

490
489

```
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 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> 93
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor G402R)

<400> 93

```
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
```

491

```
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 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> 94
<211> 466

492

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor D403H)

<400> 94

```
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 Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys
385                 390                 395                 400
```

993

```
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> 95
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor R413Q)

<400> 95

```
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
```

496
APB SM

```
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> 96
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor T419M)

<400> 96

```
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 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> 97
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor G435E)

```
<400> 97
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
```

496
495

```
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
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> 98
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

492
496

<220>
<223> Variante de FVII (precursor E445K)

<400> 98

```
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 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> 99
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor R375W)

<400> 99

```
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 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> 100
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante de FVII (precursor R375K)

<400> 100
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 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> 101
<211> 304
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Procursor de isforma a de TFPI

<400> 101

```
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
```

501

```
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> 102
<211> 276
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Isoforma a de TFPI madura

<400> 102

```
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
            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> 103
<211> 251
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor de isoforma b de TFPI

<400> 103

```
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
```

503

<210> 104
<211> 222
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Isoforma b de TFPI madura

<400> 104
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> 105
<211> 213
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TFPI-2 maduro

<400> 105
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

504
803

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
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> 106
<211> 55
<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>
<223> BPTI 5L15 K-1

<400> 106
Ala Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Asp Gly Pro Cys Arg Ala
1 5 10 15
Leu His Leu Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
20 25 30
Phe Tyr Tyr Gly Gly Cys Leu Ala Lys Arg Asn Asn Phe Glu Ser Ala
35 40 45
Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys
50 55

<210> 107
<211> 245
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Quimotripsinógeno B maduro

<400> 107
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> 108
<211> 3141
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante 1 de la transcripción de FVII

<400> 108

```
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 atggggctc 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 gtgggggca aggtgtgccc caaagggag 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
```

506
SOS #59

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 cagggggagtg 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 cacaattttc 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> 109
<211> 3075
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante 2 de la transcripción de FVII

<400> 109
agtcccatgg ggaatgtcaa caggcagggg cagcactgca gagatttcat catggtctcc 60
caggccctca ggctcctctg ccttctgctt gggcttcagg gctgcctggc tgcagtcttc 120
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

507
508

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
ccctagccca 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 cacccaaatg tatttctccc ttcgctgggt gccgggctgc acagactatt 2340
ccccacctac ttcccagctt cacaataaac ggctgcgtct cctccgcaca cctgtggtgc 2400
ctgccaccca ttgggttgcc catgattcat ttttggagcc cccggtgctc atcctctgag 2460
atgctctttt ctttcacaat tttcaacatc actgaaatga accctcacat ggaagctatt 2520
ttttaaaaac aaaagctgtt tgatagatgt ttgaggctgt agctcccagg atcctgtgga 2580
attggatgtt ttctccctgc 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 catccctgca gggccgtcct gggcaccact 2880
ggcactcaca gcagcaaggt gggcaccatt ggcactcaca gcagcaaggc aggcaccagc 2940
aacccacctc gggggcactc aggcatcatc tacttcagag cagacagggt ctatgaacta 3000
cagccgtggg ctgcttccaa ggcaccctgc tcttgtaaat aaagttttat gggaacacaa 3060
aaaaaaaaaa aaaaa 3075

<210> 110
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Dominio Gla del factor IX

<400> 110
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
35 40 45

<210> 111

<211> 45
<212> PRT
<213> Homo sapiens

508
SCT
32-1

<220>
<223> Dominio Gla del factor X

<400> 111
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> 112
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Dominio Gla de protrombina/trombina

<400> 112
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> 113
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Dominio Gla de la proteína C

<400> 113
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> 114
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Dominio Gla de la proteína S

509

<400> 114
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> 115
<211> 47
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Dominio Gla de osteocalcina (proteína Gla ósea)

<400> 115
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> 116
<211> 47
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Dominio Gla de proteína Gla de matriz

<400> 116
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> 117
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Dominio Gla de proteína 6 específica para la detención de crecimiento

<400> 117
Phe Glu Glu Ala Lys Gln Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu

570
809

```
 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> 118
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Dominio Gla de la proteina Z

<400> 118
```
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> 119
<211> 45
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Dominio Gla del factor VII

<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
        35                  40                  45
```

<210> 120
<211> 40
<212> PRT
<213> Notechis scutatus scutatus

<220>
<223> Dominio Gla de protease similar a factor Xa de coagulación de veneno

<220>
<221> INSEGURO
<222> (0)...(0)
<223> Xaa podría ser cualquier aminoácido

<400> 120

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> 121
<211> 46
<212> PRT
<213> Tropidechis carinatus

<220>
<223> Dominio Gla de proteasa similar a factor Xa de coagulación de veneno

<400> 121
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> 122
<211> 464
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursor de Antitrombina III

<400> 122
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

512
514

```
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
    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> 123
<211> 432
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Antitrombina III madura

<400> 123

```
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
```

573

```
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> 124
<211> 263
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> TIOLEST
<222> (0)...(0)
```

514
SB

<223> Factor de Tejido Maduro

<400> 124
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> 125
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60Y de Factor VIIa

<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 Tyr 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> 126
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60F de Factor VIIa

<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
```

516

```
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 Phe 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> 127
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60W de Factor VIIa

<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 Trp 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> 128
<211> 406
<212> PRT

<213> Homno sapiens

<220>
<223> Variante D60L de Factor VIIa

<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 Leu 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
```

519
518 525

405

<210> 129
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60I de Factor VIIa

<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 Ile 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

520
589

```
          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> Variante K60aI de Factor VIIa

<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 Ile 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
```

521
520

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> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K60aV de Factor VIIa

<400> 131
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 Val 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> 132
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K60aF de Factor VIIa

<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 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 Phe 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> 133
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K60aW de Factor VIIa

<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 Trp 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> 134
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante G97W de Factor VIIa

<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 Ser Arg Arg
    210                 215                 220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Trp 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> 135
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante G97T de Factor VIIa

<400> 135

```
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 Thr 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> 136
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante G97I de Factor VIIa

<400> 136

```
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
```

527
826

```
          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 Ile 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> 137
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante G97V de Factor VIIa

<400> 137

520
527

```
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 Val 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> 138
<211> 406

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K192Q de Factor VIIa

<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 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 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> 139
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60K/K60aL de Factor VIIa

<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 Lys Leu 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> 140
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60F/K60aL de Factor VIIa

<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 Phe Leu 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

532
531

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> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60L/K60aL de Factor VIIa

<400> 141
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 Leu Leu 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

533

```
        375                 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> 142
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60M/K60aL de Factor VIIa

<400> 142

```
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 Met Leu 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
```

534
533

```
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> 143
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60W/K60aL de Factor VIIa

<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
            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
```

535
SBA SEQ

```
His Cys Phe Trp Leu 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> 144
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60F/K60aE de Factor VIIa

<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
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
```

536

```
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 Phe Glu 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> 145
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60W/K60aE de Factor VIIa

<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
```

537
536

```
                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 Trp Glu 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> 146
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante D60V/K60aE de Factor VIIa

<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
```

S38

S39 - Ext

```
    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 Val Glu 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> 147
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante L163V/S170bE/K188A/F225Y de Factor VIIa

<400> 147

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1               5                  10                  15
```

S39
S38

```
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
Val Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Glu 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 Tyr 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> Variante M156Q de Factor VIIa

<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
        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 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> Variante V21D/E154V/M156Q de Factor VIIa

<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
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
```

592
591

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> Variante V21D/E154V/M156Q/K188A de Factor VIIa

<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 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> 151
<211> 4278
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Vector de Secuencias de Comandos pCMV

<400> 151
atgcattagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga 60
gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca acgacccccg 120
cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg 180
acgtcaatgg 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
acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcaccaaaa 480
tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca ttgacgcaaa tgggcggtag 540
gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctggttta gtgaaccgtc agatccgcta 600
gcgattacgc caagctcgaa attaacccte actaaaggga acaaaagctg gagctccacc 660
gcggtggcgg ccgctctagc ccgggcggat cccccgggct gcaggaattc gatatcaagc 720

ttatcgatac cgtcgacctc gaggggggcc ccggtaccag gtaagtgtac ccaattcgcc 780
ctatagtgag tcgtattaca attcactcga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa 840
tggcgaatgg agatccaatt tttaagtgta taatgtgtta aactactgat tctaattgtt 900
tgtgtatttt agattccaag tcccaaggct catttcaggc ccctcagtcc tcacagtctg 960
ttcatgatca taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt aaaaaacctc 1020
ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt taacttgttt 1080
attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca 1140
tttttttcac 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
cgttccttgc 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 gccgctgga tgatcctcca gcgcggggat 3120
ctcatgctgg agttcttcgc ccaccctagg gggaggctaa ctgaaacacg gaaggagaca 3180
ataccggaag gaacccgcgc tatgacggca ataaaaagac agaataaaac gcacggtgtt 3240
gggtcgtttg ttcataaacg cggggttcgg tcccagggct ggcactctgt cgataccca 3300
ccgagacccc attgggggcca atacgcccgc gtttcttcct tttccccacc ccaccccca 3360
agttcgggng aaggcccagg gctcgcagcc aacgtcgggg cggcaggccc tgccatagcc 3420
tcaggttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc 3480
taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 3540
cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg 3600
cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg 3660
gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 3720
aatactgttc ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 3780
cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 3840
tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 3900
acggggggtt 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
tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc 4200
ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 4260
gataaccgta ttaccgcc 4278

<210> 152
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer PCR Delantero de Factor VII CBO-125

<400> 152
gcatcatgac gtgacggatc cgccaccatg gtctcccagg ccctc 45

<210> 153
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer PCR Posterior de Factor VII CBO-126

<400> 153
gatcgtacga tacgtgaatt cctagggaaa tggggctcgc aggag 45

<210> 154
<211> 1398
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> cADN de FVII (plantilla para PCR)

<400> 154
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60
gcaggcgggg tcgctaaggc ctcaggagga gaaacacggg acatgccgtg gaagccgggg 120
cctcacagag tcttcgtaac ccaggaggaa gcccacggcg tcctgcaccg gcgccggcgc 180
gccaacgcgt tcctggagga gctgcggccg cgctccctgg 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
aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 720
accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 780
tggaggaagc tgatcgcggt gctgggcgag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag 840
cagagccggc gggtggcgca ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 900
cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcactgacca tgtggtgccc 960
ctctgcctgc ccgaacggac gtttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg 1020
gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 1080
aacgtgccac ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 1140
ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1200
aaggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1260
atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttggggtgta caccagggtc 1320
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc 1380
ctgcgagccc catttccc 1398

<210> 155
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60 tipo salvaje

<400> 155
gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac tgg 33

<210> 156
<211> 33

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60K de CBO-157

<400> 156
gcggcccact gtttcaagaa aatcaagaac tgg 33

546
545

<210> 157
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60R de CBO-158

<400> 157
gcggcccact gtttcaggaa aatcaagaac tgg 33

<210> 158
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60A de CBO-159

<400> 158
gcggcccact gtttcgcgaa aatcaagaac tgg 33

<210> 159
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60a tipo salvaje

<400> 159
gcccactgtt tcgacaaaat caagaactgg agg 33

<210> 160
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aD de CBO-160

<400> 160
gcccactgtt tcgacgacat caagaactgg agg 33

<210> 161
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aE de CBO-161

<400> 161
gcccactgtt tcgacgagat caagaactgg agg 33

<210> 162
<211> 33

542
546

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> alelo
<222> (0)...(0)

<220>
<223> Primer K60aA de CBO-162

<400> 162
gcccactgtt tcgacgcgat caagaactgg agg 33

<210> 163
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aL de CBO-163

<400> 163
gcccactgtt tcgacctcat caagaactgg agg 33

<210> 164
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aY de CBO-164

<400> 164
gcccactgtt tcgactatat caagaactgg agg 33

<210> 165
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60c tipo salvaje

<400> 165
tgttttcgaca aaatcaagaa ctggaggaac ctg 33

<210> 166
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60cD de CBO-165

<400> 166

548

tgtttcgaca aaatcgacaa ctggaggaac ctg 33

<210> 167
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60cE de CBO-166

<400> 167
tgtttcgaca aaatcgagaa ctggaggaac ctg 33

<210> 168
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60cA de CBO-167

<400> 168
tgtttcgaca aaatcgcgaa ctggaggaac ctg 33

<210> 169
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer T99 tipo salvaje

<400> 169
tacgtcccgg gcaccaccaa ccacgacatc gcg 33

<210> 170
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer T99A de CBO-168

<400> 170
tacgtcccgg gcaccgcgaa ccacgacatc gcg 33

<210> 171
<211> 33
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer R147 tipo salvaje

<400> 171
ggccagctgc tggaccgtgg cgccacggcc ctg 33

<210> 172
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer R147D de CBO-169 R147D

<400> 172
ggccagctgc tggacgacgg cgccacggcc ctg 33

<210> 173
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer R147E de CBO-170

<400> 173
ggccagctgc tggacgaggg cgccacggcc ctg 33

<210> 174
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer R147A de CBO-171

<400> 174
ggccagctgc tggacgcggg cgccacggcc ctg 33

<210> 175
<211> 33

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K192 tipo salvaje

<400> 175
agcaaggact cctgcaaggg ggacagtgga ggc 33

<210> 176
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K192R de CBO-172

<400> 176
agcaaggact cctgccgcgg ggacagtgga ggc 33

<210> 177
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer tipo salvaje de múltiples mutantes

<400> 177
gtggtctccg cggcccactg tttcgacaaa atcaagaact ggaggaacct gatcgcggtg 60

<210> 178
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60R / K60aE / K60cE de CBO-177

<400> 178

gtggtctccg cggcccactg tttcagggag atcgaaaact ggaggaacct gatcgcggtg 60

<210> 179
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60 K K60aE / K60cE de CBO-178

<400> 179
gtggtctccg cggcccactg tttcaaggag atcgaaaact ggaggaacct gatcgcggtg 60

<210> 180
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60R / K60aM / K60cE de CBO-179

<400> 180
gtggtctccg cggcccactg tttcaggatg atcgaaaact ggaggaacct gatcgcggtg 60

<210> 181
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aI de CBOLH-54

<400> 181
gcccactgtt tcgacatcat caagaactgg agg 33

<210> 182
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aV de CBOLH-55

<400> 182
gcccactgtt tcgacgtcat caagaactgg agg 33

<210> 183
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aF de CBOLH-56

<400> 183
gcccactgtt tcgacttcat caagaactgg agg 33

<210> 184
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aW de CBOLH-57

<400> 184
gcccactgtt tcgactggat caagaactgg agg 33

<210> 185
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Primer K60aM de CBOLH-58

<400> 185
gcccactgnt tcgacatgat caagaactgg agg 33

<210> 186
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60F de CBOLH-59

<400> 186
gcggcccact gtttctttaa aatcaagaac tgg 33

<210> 187
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60Y de CBOLH-60

<400> 187
gcggcccact gtttcataaa aatcaagaac tgg 33

<210> 188
<211> 33

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60W de CBOLH-61

<400> 188
gcggcccact gtttctggaa aatcaagaac tgg 33

<210> 189
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60L de CBOLH-62

<400> 189
gcggcccact gtttcgagaa aatcaagaac tgg 33

<210> 190
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60I de CBOLH-63

<400> 190
gcggcccact gtttcatcaa aatcaagaac tgg 33

<210> 191
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer G97 tipo salvaje

<400> 191
agcacgtacg tcccgggcac caccaaccac gac 33

<210> 192
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer G97W de CBOLH-64

<400> 192
agcacgtacg tcccgtggac caccaaccac gac 33

<210> 193
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer G97T de CBOLH-65

<400> 193
agcacgtacg tcccgacgac caccaaccac gac 33

<210> 194
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer G97I de CBOLH-66

<400> 194
agcacgtacg tcccgatcac caccaaccac gac 33

<210> 195
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer G97V de CBOLH-67

557
886

<400> 195
agcacgtacg tcccggtcac caccaaccac gac 33

<210> 196
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K192Q de CBOLH-68

<400> 196
agcaaggact cctgccaggg ggacagtgga ggc 33

<210> 197
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aL/D60 tipo salvaje

550
884

<400> 197
gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac tgg 33

<210> 198
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aL/D60K de CBOLH-69

<400> 198
gcggcccact gtttcaagct catcaagaac tgg 33

<210> 199
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aL/D60L de CBOLH-70

<400> 199
gcggcccatt gtttcctcct catcaagaac tgg 33

<210> 200
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aL/D60F de CBOLH-71

<400> 200
gcggcccatt gtttcmtctt catcaagaac tgg 33

<210> 201
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aL/D60M de CBOLH-72

<400> 201
gcggcccact gtttcatgct catcaagaac tgg 33

<210> 202
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer K60aL/D60W de CBOLH-73

<400> 202
gcggcccact gtttctggct catcaagaac tgg 33

<210> 203
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60F de CBOLH-74

<400> 203
gcggcccact gtttctttga gatcaagaac tgg 33

<210> 204
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer D60W de CBOLH-75

<400> 204
gcggcccact gtttctggga gatcaagaac tgg 33

<210> 205
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Primer D60V de CBOLH-76

<400> 205
gcggcccact gtttcgtcga gatcaagaac tgg 33

<210> 206
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R290N

<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 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 Asn 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

563
562

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> R290Q

<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 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

564

563

Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285
Asp Gln 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> 208
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R290K

<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 Lys 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> 209
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R290M

<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
```

566
565

```
                 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 Met 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> 210
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R290V

<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
```

567
566 ~~590~~

```
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 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 Val 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> 211
<211> 404
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K341N

<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
```

563
567 564

```
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 Asn 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> 212
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K341M

<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
```

569
568

```
          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 Met 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> 213
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K341D

<400> 213

570
569

```
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 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> 214
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

57
S40

<220>
<223> G237T238insA

<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 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 Ala 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> 215
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> G237T238insS

<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 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 Ser 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> 216
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> G237T238insV

<400> 216

```
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 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
```

574
573

```
                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> 217
<211> 408
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> G237T238insAS

<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
            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 Ala Ser 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> 218
<211> 408
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> G237T238insSA

<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 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 Ser Ala Thr
225                 230                 235                 240
Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu
```

575
575 499

```
                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> 219
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D196K197insK

<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 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 Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val
        195                 200                 205
```

572
576

```
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> 220
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D196K197insR

<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 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
```

570
577
661

```
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 Arg 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> 221
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D196K197insY

<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
```

```
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 Tyr 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> 220
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D196K197insW

<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 Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
    50                  55                  60
```

588
S29

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 Trp 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> 223
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D196K197insA

<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

58, 580 404

```
                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 Ala 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> 224
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D196K197insM

<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 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 Met 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> 225
<211> 407

503
502
562/561

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K197I198insE

<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 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 Glu 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
```

584 588 ~~588~~ 467

405

<210> 226
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K197I198insY

<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 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 Tyr 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
```

584
585
564 408

```
        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> 227
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K197I198insA

<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 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 Ala 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
```

586 SBT
565 16

```
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> 228
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K197I198insS

<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 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 Ser 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
```

S87

```
            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> 229
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K197E/K341Q

<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 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 Glu 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 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> 230
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K197L/K341Q

<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 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 Leu 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 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> 231
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> G237V/K341Q

<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 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 Val 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 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> 232
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> K197E/K199E

<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
```

59/570 4

```
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 Glu 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 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> 233
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K197E/G237V

<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 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 Glu 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 Val 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> 234
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K149E/K341Q

<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 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 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 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> 235
<211> 406
<212> PRT

594
593
573

<213> Homo sapiens

<220>
<223> K197E/G237V/K341Q

<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 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 Glu 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 Val 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 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
```

595
~~594~~
~~574~~

<210> 236
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Gla intercambio FIX

<400> 236

```
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
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
```

596
595
595

```
        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> 237
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Gla intercambio FX

<400> 237

```
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 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
```

592
596
576

```
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> 238
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Gla Intercambio Prot C

<400> 238

```
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 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
```

590 597
597/61

```
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> 239
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Gla Intercambio Prot S

<400> 239

```
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 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
```

599
598
598 1b

```
    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> 240
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Gla intercambio Trombina

<400> 240

```
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 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
                405
```

<210> 241
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V158D/G237V/E296V/M298Q

<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 His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125
```

601 600
580-1/1

```
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 Val 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> 242
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K197E/G237V/M298Q

<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
```

602
~~601~~
~~581~~ 1pc

```
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 Glu 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 Val 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> 243
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K197E/G237V/M298Q/K341Q

<400> 243

```
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
```

603 602
582

```
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 Glu 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 Val 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 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> 244
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q

<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 Glu 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 Val 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 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> 245

<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> G237V/M298Q

<400> 245

```
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 Val 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> 246
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> G237V/M298Q/K341Q

<400> 246
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 Val 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 Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr

602
606
58611

```
                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> 247
<211> 407
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> M298Q/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
    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 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> 248
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K197E/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 Glu 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
```

609

```
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> M298Q/K341D

<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
            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
```

~~609~~
610
~~589-44~~

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 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> 250
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K197E/K199E/K341Q

<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

610
611
SEQ 11/11

```
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 Glu 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 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 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
```

612

~~611~~

~~591~~ 1/12

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0089049

Bogotá D.C., Septiembre 06 de 2013 - 11:50:44

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	560802491	06/09/2013	63.145.000.00

*** 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 COMERCIO6
No. 13-225455- -00000-0000
Fecha: 2013-09-23 14:15:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: ~~593~~ 614

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-111636- -00012-0000
Fecha: 2013-09-23 14:15:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: ~~593~~ 614

612
~~592~~
613.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0093752

Bogotá D.C., Septiembre 18 de 2013 - 10:38:20

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 83.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	93743	18/09/2013		3.265.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
28	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	840.000.00
				$840.000.00

SON: **OCHOCIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-******-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 13-225455- -00000-0000
Fecha: 2013-09-23 14:15:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: ~~593~~ 614

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-111636- -00012-0000
Fecha: 2013-09-23 14:15:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: ~~593~~ 614

614
613
593