(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 782 078**

(51) Int. CI.:

C12N 9/64 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2011 PCT/US2011/059233**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061654**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2011 E 11781973 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2635677**

(54) Título: **Polipéptidos del factor IX modificados y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

03.11.2010 US 456298 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.09.2020

(73) Titular/es:

CATALYST BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
611 Gateway Blvd., Suite 710
South San Francisco, CA 94080, US

(72) Inventor/es:

MADISON, EDWIN, L.;
THANOS, CHRISTOPHER y
BLOUSE, GRANT, ELLSWORTH

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos del factor IX modificados y usos de los mismos

Solicitudes relacionadas

Se reivindica el beneficio de prioridad a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. de Serie 61/456,298, titulada "POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR IX MODIFICADO Y USOS DE LOS MISMOS", presentada el 3 de noviembre de 2010 otorgada a Edwin Madison, Christopher Thanos y Grant Ellsworth Blouse.

Esta solicitud también está relacionada con la correspondiente Solicitud de los Estados Unidos No 13/373,118, presentada el mismo día, titulada "POLIPÉPTIDOS DE FACTOR IX MODIFICADO Y USOS DE LOS MISMOS", que también reivindica la prioridad a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. de Serie 61/456,298.

Campo de la invención

Se proporcionan polipéptidos FIX modificados. Los polipéptidos FIX se modifican para exhibir propiedades mejoradas, tales como una mayor actividad coagulante en comparación con los polipéptidos FIX no modificados. También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican estos polipéptidos, y métodos para utilizar los polipéptidos FIX modificados.

Antecedentes

Los polipéptidos del Factor IX (FIX) producidos de forma recombinante se han aprobado para el tratamiento de la hemofilia, en particular la hemofilia B. También son de interés terapéutico los polipéptidos FIX que muestran actividades anticoagulantes útiles en el tratamiento de enfermedades trombolíticas. Por lo tanto, FIX, como otros factores de coagulación, son agentes terapéuticos importantes para las terapias procoagulantes y anticoagulantes. Subsiste la necesidad de polipéptidos FIX para uso terapéutico. Por lo tanto, entre los objetos de este documento, es un objeto proporcionar polipéptidos FIX modificados que están diseñados para tener propiedades terapéuticas mejoradas.

El documento WO2009137254 describe los péptidos FIX con uno o más sitios de glicosilación, que pueden exhibir una estabilidad in vitro o in vivo aumentada, tal como una vida media en plasma más larga. Este documento también describe el uso de polipéptidos FIX para su uso en el tratamiento de la hemofilia B.

Por lo tanto el documento WO2007149406 describe polipéptidos FIX modificados, composiciones farmacéuticas y métodos para fabricar polipéptidos FIX modificados.

J. Rohlena et al. 2003, ("Residues Phe342-Asn346 of Activated Coagulation Factor IX Contribute to the Interaction with Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein", Journal of Biological Chemistry, vol. 278, No. 11, páginas 9394-9401,) es un estudio académico de la interacción entre FIX activado y la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP).

Resumen

La presente invención proporciona un polipéptido FIX modificado, que comprende un reemplazo de aminoácidos en un polipéptido FIX no modificado, en el que:

el reemplazo de aminoácidos se selecciona de entre R318Y, R318E, R318F y R318W en un polipéptido FIX maduro que tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3, o el mismo reemplazo en un residuo de aminoácido correspondiente en un polipéptido FIX no modificado;

residuos de aminoácidos correspondientes se identifican mediante alineación del polipéptido FIX no modificado con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3;

el polipéptido FIX no modificado consiste de una secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NOS: 2, 3, 20 o 325 o es FIXa no modificado, que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3;

el polipéptido FIX modificado consiste de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 modificaciones adicionales;

modificaciones son reemplazos, adiciones o supresiones de aminoácidos, o cualquier combinación de los mismos;

la forma FIXa modificada del polipéptido FIX exhibe aumento de la actividad procoagulante en comparación con la forma FIXa no modificado del polipéptido FIX que no tienen las modificaciones; y

actividad procoagulante se evalúa en un ensayo que mide actividad coagulante de sangre.

Se proporcionan polipéptidos FIX modificados de acuerdo con las reivindicaciones. Los polipéptidos FIX modificados proporcionados han mejorado las propiedades terapéuticas procoagulantes en comparación con un polipéptido FIX no modificado. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos FIX modificados y los polipéptidos FIX modificados de la invención para uso en los métodos de tratamiento, tales como para el tratamiento de trastornos hemorrágicos. Entre los polipéptidos FIX modificados se proporcionan en este documento aquellos que contienen dos reemplazos de aminoácidos en el polipéptido FIX no modificado, en el que el primer reemplazo de aminoácidos está en la posición 318 en un polipéptido FIX maduro que tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3, y el segundo reemplazo de aminoácidos está en una posición que corresponde a una posición seleccionada de entre 5, 53, 61, 64, 85, 103, 104, 105, 106, 155, 158, 159, 167, 203, 205, 228, 239, 247, 249, 251, 260, 284, 293, 312, 333, 338, 343, 345, 346, 400, 403, 410, 412 y 413 en un polipéptido FIX maduro que tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3.

En algunos ejemplos, el segundo reemplazo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácidos seleccionado de entre alanina (Ala, A); arginina (Arg, R); asparagina (Asn, N); ácido aspártico (Asp, D); cisteína (Cys, C); ácido glutámico (Glu, E); glutamina (Gln, Q); glicina (Gly, G); histidina (His, H); isoleucina (Ile, I); leucina (Leu, L); lisina (Lys, K); metionina (Met, M); fenilalanina (Phe, F); prolina (Pro, P); serina (Ser, S); treonina (Thr, T); triptófano (Trp, W); tirosina (Tyr, Y); y valina (Val, V), que proporciona el aminoácido de reemplazo no es el mismo que el aminoácido reemplaza. Por ejemplo, reemplazos de aminoácidos de ejemplo incluyen S53A, S61A, D64A, D64N, D85N, A103N, D104N, N105S, K106S, K106N, V108S, Y155F, Y155H, Y155L, Y155Q, S158A, S158D, S158E, T159A, N167D, N167Q, T169A, T172A, T179A, V202M, V202Y, D203M, D203N, D203Y, A204M, A204Y, F205T, K228N, E239A, E239N, E239S, E239R, E239K, T241N, H243S, K247N, N249S, I251S, H257F, H257E, H257F, H257Y, H257S, Y259S, N260S, A262S, K265T, Y284N, K293E, K293A, R312Q, R312A, R312Y, R312L, F314N, H315S, K316S, K316N, K316A, K316E, K316S, K316M, G317N, S319N, A320S, L321S, R333A, R333E, R333S, R338A, R338D, R338E, R338L, T343R, T343E, T343D, T343Q, F342I, Y345A, Y345T, N346D, N346Y, K392N, K394S, K400A, K400E, R403A, R403E, E410Q, E410N, E410D, E410S, E410A, T412A, T412V o K413N. Otros reemplazos de aminoácidos de ejemplo son reemplazos de aminoácidos conservadores.

En algunos casos, el segundo reemplazo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácidos seleccionado de entre alanina; arginina; asparagina; ácido aspártico; ácido glutámico; glutamina; histidina; leucina; lisina; fenilalanina; serina; treonina; tirosina; o valina. Por ejemplo, reemplazos de aminoácidos de ejemplo incluyen K5A, S53A, S61A, D64A, D64N, D85N, Y155F, Y155H, Y155Q, S158A, S158D, S158E, T159A, N167D, N167Q, E239A, E239N, E239S, E239R, E239K, N260S, Y284N, K293E, K293A, R312Q, R312A, R312Y, R312L, R333A, R333E, R333S, R338A, R338E, R338L, N346D, N346Y, K400A, K400E, R403A, R403E, E410Q, E410N, E410D, E410S, E410A, T412A, T412V o K413N. Otros reemplazos de aminoácidos de ejemplo son reemplazos de aminoácidos conservadores.

El primer reemplazo de aminoácidos está en la posición 318 tal como, por ejemplo, R318Y. En ejemplos adicionales, el segundo reemplazo de aminoácidos está en una posición que corresponde a una posición seleccionada de entre 155, 247, 249, 338, 403 y 410, tal como, por ejemplo, Y155F, K247N, N249S, R338E, R403E y E410N.

Entre los polipéptidos FIX modificados se proporcionan en este documento aquellos que contienen reemplazos de aminoácidos seleccionados de entre los reemplazos de aminoácidos que corresponde a R318E/R403E, R318Y/E410N, K228N/R318Y, R318Y/R338E andR318A/R403A.

En algunos ejemplos, los polipéptidos FIX modificados de acuerdo con las reivindicaciones contienen uno o más reemplazos de aminoácidos adicionales, tal como uno o más en una posición seleccionada de entre 53, 61, 64, 85, 103, 104, 105, 106, 108, 155, 158, 159, 167, 169, 172, 179, 202, 203, 204, 205, 228, 239, 241, 243, 247, 249, 251, 257, 259, 260, 262, 265, 284, 293, 312, 314, 315, 316, 317, 319, 321, 333, 338, 343, 346, 345, 392, 394, 400, 403, 410, 412 y 413 en un polipéptido FIX maduro que tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, los polipéptidos FIX modificados pueden contener un reemplazo de aminoácidos adicional seleccionado de entre Y5A, S53A, S61A, D64A, D64N, D85N, A103N, D104N, N105S, K106S, K106N, V108S, Y155F, Y155H, Y155Q, S158A, S158D, S158E, T159A, N167D, N167Q, T169A, T172A, T179A, V202M, V202Y, D203M, D203Y, A204M, A204Y, K228N, E239A, E239N, E239S, E239R, E239K, T241N, H243S, K247N, N249S, I251S, H257F, H257E, H257F, H257Y, H257S, Y259S, N260S, A262S, K265T, Y284N, K293E, K293A, R312Q, R312A, R312Y, R312L, F314N, H315S, K316S, K316N, K316A, K316E, K316S, K316M, G317N, S319N, A320S, L321S, R333A, R333E, R333S, R338A, R338E, R338L, T343R, T343E, T343Q, F342I, Y345A, Y345T, N346D, N346Y, K392N, K394S, K400A, K400E, R403A, R403E, E410Q, E410N, E410D, E410S, E410A, T412A, T412V y K413N, o un reemplazo de aminoácidos conservador.

En algunos ejemplos, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento contienen reemplazos de aminoácidos seleccionados de entre los reemplazos de aminoácidos que corresponde a R318Y/R338E/R403E, D203N/F205T/R318Y, R318Y/R338E/E410N, K228N/R318Y/E410N, R318Y/R403E/E410N, R318Y/R338E/R403E/E410N, D203N/F205T/R318Y/E410N, A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N, K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N, I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/R318Y/E410N/R338E, I251S/R318Y/E410N/R338E, D104N/K106S/I251S/R318Y/E410N/R338E, A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N,

Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N, K247N/N249S/R318Y/R338E/E240N, Y155F/R318Y/R338E/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N, R318Y/R338E/R403E/E410S, R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V, R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A, R318Y/R338E/R403E/T412A, R318Y/R338E/E410S, R318Y/R338E/T412A, R318Y/R338E/E410N/T412V, D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N, N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N, R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N, Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N, K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N y R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N.

También se proporcionan en este documento polipéptidos FIX modificados de acuerdo con las reivindicaciones que contienen una modificación en un polipéptido FIX no modificado es decir un reemplazo de aminoácidos seleccionado de R318Y, R318E, R318F y R318W y modificaciones adicionales seleccionadas de entre las modificaciones que corresponden a los reemplazos de aminoácidos S61A, D64A, Y155F, N157D, S158A, S158D, S158E, N167D, N167Q, T169A, T172A, D203M, D203Y, A204M, A204Y, E239S, E239R, E239K, H257F, H257E, R312Y, R312L, K316M, T343R, T343E, F342I, N346Y, K400E, E410D, E410S, E410A, T412A y T412V en un polipéptido FIX maduro que tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3.

En casos particulares, el polipéptido FIX modificado de acuerdo con las reivindicaciones contiene la mutación adicional Y155F. En casos adicionales, el polipéptido FIX modificado contiene la mutación R318Y. Por ejemplo, se proporcionan polipéptidos FIX modificados que contienen R318Y y una modificación en una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones que corresponden a 338, 403 y 410 de un polipéptido FIX maduro que tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3, tal como, por ejemplo, R338E, R403E o E410N.

En algún ejemplo, los polipéptidos FIX modificados de acuerdo con las reivindicaciones contienen una o más modificaciones en una posición de aminoácido seleccionada de entre las posiciones que corresponden a 5, 53, 61, 64, 85, 103, 104, 105, 106, 108, 148, 155, 157, 158, 159, 167, 169, 172, 179, 202, 202, 203, 204, 205, 228, 239, 241, 243, 247, 249, 251, 257, 259, 260, 262, 265, 284, 293, 312, 314, 315, 316, 317, 319, 320, 321, 333, 338, 343, 345, 346, 392, 394, 400, 403, 410, 412 y 413 de un polipéptido FIX maduro que tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3. Las modificaciones de ejemplo se seleccionan de entre modificaciones que corresponden a reemplazos de aminoácidos K5A, S53A, S61A, D64A, D64N, D85N, A103N, D104N, N105S, N105T, K106N, K106N, K106T, V108S, V108T, T148A, Y155F, Y155H, N157D, N157Q, S158A, S158D, S158E, T159A, N167D, N167Q, T169A, T172A, T179A, V202M, V202Y, D203M, D203Y, D203N, A204M, A204Y, F205S, F205T, K228N, E239N, T241N, E239S, E239A, E239R, E239K, H243S, H243T, K247N, N249S, N249T, I251S, I251T, H257F, H257Y, H257E, H257S, N260S, A262S, A262T, Y284N, K293E, K293A, R312Q, R312A, R312Y, R312L, F314N, H315S, K316S, K316T, K316M, G317N, S319N, A320S, L321N, L321S, L321T, R333A, R333E, R338A, R338E, T343R, T343E, T343Q, F342I, Y345A, Y345T, N346D, N346T, K392N, K394S, K394T, K400A, K400E, R403A, R403E, E410Q, E410S, E410N, E410A, E410D, T412V, T412A y K413N.

Por lo tanto, se proporcionan en este documento polipéptidos FIX modificados que contienen modificaciones seleccionadas de entre modificaciones que corresponden a reemplazos de aminoácidos R318E/R403E, R318Y/E410N, R318Y/R338E/R403E, D203N/F205T/R318Y, K228N/R318Y, R318Y/R338E/E410N, K228N/R318Y/E410N, R318Y/R403E/E410N, R318Y/R338E/R403E/E410N, D203N/F205T/R318Y/E41 0N, A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N, K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N, I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/R318Y/E410N/R338E,I251S/R318Y/E410N/R338E, D104N/K106S/I251S/R318Y/E410N/R338E, A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N, K247N/N249S/R318Y/R338E/E240N, Y155F/R318Y/R338E/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N, R318Y/R338E/R403E/E410S, R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V, R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A, R318Y/R338E/R403E/T412A, R318Y/R338E/E410S, R318Y/R338E/T412A, R318Y/R338E/E410N/T412V, D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N, N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N, R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N, Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N, K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N, R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, y R318Y/R338E. En ejemplos particulares, los polipéptidos FIX modificados contienen modificaciones que corresponden a los reemplazos de aminoácidos R318Y/R338E/R403E/E410N o Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N.

El polipéptido FIX no modificado contiene una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 2, 3, 20 o 325. En ejemplos adicionales, el polipéptido FIX modificado es un fragmento activo de un polipéptido FIX no modificado; y el polipéptido FIX modificado contiene las modificaciones.

Cualquiera de los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento pueden contener una o más modificaciones que introducen o eliminan uno o más sitios de glicosilación en comparación con el polipéptido FIX no modificado. En algunos ejemplos, los sitios de glicosilación se seleccionan de entre, sitios de glicosilación N, O y S. En un ejemplo, uno o más sitios de glicosilación N se introducen en comparación con el polipéptido FIX no modificado. En algunos ejemplos, el sitio de glicosilación N se introduce en posiciones de aminoácido que corresponden a las posiciones seleccionadas de entre Y1, S3, G4, K5, L6, E7, F9, V10, Q11, G12, L14, E15, R16, M19, E20, K22, S24, F25, E26, E27, A28, R29, E30, V31, F32, E33, T35, E36, R37, T39, E40, F41, W42, K43, Q44, Y45, V46, D47, G48, D49, Q50, E52, S53, N54, L57, N58, G59, S61, K63, D65, I66, N67, S68, Y69, E70, W72, P74, F77, G79, K80, N81, E83, L84, D85, V86, T87, N89, 190, K91, N92, R94, K100, N101, S102, A103, D104, N105, K106, V108, S110, E113, G114, R116, E119, N120, Q121, K122, S123, E125, P126, V128, P129, F130, R134, V135, S136, S138, Q139, T140, S141, K142, A146, E147, A148, V149, F150, P151, D152, V153, D154, Y155, V156, S158, T159, E160, A161, E162, T163, I164, L165, D166, 1168, T169, Q170, S171, T172, Q173, S174, F175, N176, D177, F178, T179, R180, G183, E185, D186, K188, P189, K201, V202, D203, E213, E224, T225, G226, K228, E239, E240, T241, H243, K247, N249, 1251, R252, 1253, P255, H257, N258, N260, A261, A262, 1263, N264, K265, A266, D276, E277, P278, V280, N282, S283, Y284, D292, K293, E294, N297, 1298, K301, F302, G303, S304, Y306, R312, F314, H315, K316, G317, S319, L321, V322, Y325, R327, P329, L330, D332, R333, A334, T335, L337, R338, K341, F342, T343, Y345, N346, H354, E355, G357, R358, Q362, E372, E374, G375, E388, M391, K392, G393, K394, R403, N406, K409, E410, K411, y K413 del polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3.

Las modificaciones de ejemplo que introducen una glicosilación incluye aquellas seleccionadas de entre la modificación que corresponde a reemplazos de aminoácidos Y1N, Y1N + S3T, S3N + K5S/T, G4T, G4N + L6S/T, K5N + E7T, L6N + E8T, E7N + F9T, F9N +Q11S/T, V10N+G12S/T, Q11N + N13T, G12N + L14S/T, L14N + R16T, E15T, E15N + E17T; R16N +C18S/T, M19N + E21T; E20N + K22T, K22N, S24N + E26T; F25N + E27T; E26N + A28T; E27N + R29T; A28N + E30T; R29N+V31S/T, E30N + F32T; V31N + E33T; F32N + N34T, E33N, T35N + R37S/T, E36T; E36N; R37N, T39N + F41S/T, E40N + W42T, F41N + K43S/T, W42N +Q44S/T, K43N + Y45T; Q44N+V46S/T, Y45N + D47T, V46N +G48S/T, D47N + D49S/T, G48N +Q50S/T, D49N +C51S/T, Q50N + E52S/T, E52N + N54T, S53N + P55S/T, C56S/T, L57N+G59S/T, G59N + S61T; G60S/T, S61N + K63S/T, K63N + D65S/T, D65N + N67S/T, I66N + S68S/T, Y69S/T, Y69N +C71S/T, S68N + E70S/T, E70N+W72S/T, W72N + P74S/T, P74N+G76S/T, F75N, G76N + E78T, E78N + K80T, F77T, F77N+G79S/T, G79N + N81S/T, K80N+C82S/T, E83S/T, E83N + D85S/T, L84N+V86S/T, D85N, V86A, V86N +C88S/T, T87N + N89S/T, I90N + N92S/T, K91S/T, I90N + N92S/T, K91N+G93S/T, R94S/T, R94N + E96S/T, K100N, A103S/T, S102N + D104S/T, A103N + N105S/T, D104N + K106S/T, V107S/T, K106N+V108S/T, V108N+V110S/T, S111N, E113N+Y115S/T, G114N + R116S/T, R116N+A118S/T, E119N +Q121S/T, K122S/T, Q121N + S123S/T, K122N+C124S/T S123N + E125S/T, E125N+A125S/T, P126N+V128S/T, A127N + P129T, V128N + F130S/T, P129N + P131S/T, F130N+C132S/T, R134N, V135N+V137S/T, S136N, S138N, V137N + Q139T; Q139N, T140N + L142S/T, S141N + L143S/T, K142N, A146N+A148S/T, E147N+V149S/T, T148N+ F150S/T, V149N + P151S/T, F150N + D152S/T, P151N+V153S/T, D152N + D154S/T, V153N+Y155S/T, D154N+V156S/T, Y155N + N157S/T, V156N, S158N + E160S/T, T159N+A161S/T, E160N + E162S/T, A161N, E162N +I164S/T, T163N + L165S/T, I164N + D166S/T, L165N + N167S/T, D166N + I168S/T, I168N+Q170S/T, T169N, Q170N, S171N +Q173S/T, T172N, Q173N + F175S/T, S174N + N176S/T, F175N + D177S/T, F178S/T, D177N, D177E, F178N + R180S/T, T179N+V181S/T, R180N+V182S/T, G183 + E185S/T, G184N + D186T, E185N+A187S/T, D186N + K188S/T, A187N + P189T, K188N+G190S/T, P189N +Q181S/T, G200N + V202T, K201N + D203S/T, K201T, V202N+A204S/T, D203N + F205S/T, E213N +W215S/T, K214T, V223T, E224N+G226S/T, T225N+V227S/T, G226N + K228S/T, V227N + I229T, K228N, H236N + I238T; I238N + E240T; E239N, E240N + E242S/T, E242N, T241N + H243S/T, H243N + E245S/T, K247N + N249S/T, V250N + R252T, I251S/T, I251N + I253S/T, R252N + I254S/T, I253N + P255S/T, P255N + H257S/T, H257N+Y259S/T, N260S/T, A262S/T, A261N + I263S/T, A262N + N264S/T, I263N + K265S/T, K265N + N267S/T, A266N + H268S/T, D276N + P278S/T, P278N+V280S/T, E277N + L279S/T, V280N + N282S/T, Y284S/T, S283N+V285S/T, Y284N, D292N + K294S/T, K293N+Y295S/T, E294N, F299S/T, I298N + L300S/T, K301N+G303S/T, F302N, G303N +G305S/T, S304N+Y306S/T, Y306N +S308S/T, R312N + F314S/T, V313N + H315T, F314N + K316S/T, H315N +G317S/T, K316N + R138S/T, G317N, S319N + L321S/T, A320N + V322T, L321N + L323S/T, V322N+Q324S/T, Y325N + R327S/T, R327N + P329S/T, P329N+V331S/T, L330N + D332S/T, D332N+A334S/T, R333N, A334N+C336S/T, T335N + L337S/T, L337N, R338N, S339N + K341T, T340N + F342T; K341N, F342N + I344S/T, T343N+Y345S/T, Y345N + N347S/T, M348S/T, G352N + H354T, F353N, F353N + E355T, H354N +G356S/T, H354V, H354I, E355T, E355N+G357S/T, G356N + R358T, G357N + D359S/T, R358N, Q362N + D364S/T, V370N; T371V; T371I; E372T, E372N + E374S/T, E374N, G375N, W385N + E387T; G386N + E388T, E388N+A390S/T, A390N + K392T, M391N+G393S/T, K392N + K394S/T, K392V, G393T, G393N+Y395S/T, K394N+G396S/T, R403N+V405S/T, I408S/T, K409N + K411S/T, E410N, K411N + K413S/T, y K413N. En algunos ejemplos, el polipéptido FIX modificado tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 modificaciones que introducen y/o eliminan uno o más sitios de glicosilación.

También se proporcionan en este documento polipéptidos FIX modificados de acuerdo con las reivindicaciones que contienen una o más modificaciones que eliminan uno o más sitios de glicosilación N en comparación con el polipéptido FIX no modificado. Por ejemplo, se pueden eliminar los sitios de glicosilación N en una posición de aminoácido que corresponde a N157 o N167 del polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3. Modificaciones de ejemplo que eliminan un sitio de glicosilación N incluyen aquellas seleccionadas de entre modificaciones que corresponden a los reemplazos de aminoácidos N157D, N157Q, N167D y N167Q. En ejemplos adicionales, el polipéptido FIX contiene una o más modificaciones que eliminan uno o más sitios de glicosilación O en comparación con el polipéptido FIX no modificado. Por ejemplo, sitos de glicosilación O que se pueden eliminar incluyen aquellas posiciones aminoácido que

corresponden a posiciones seleccionadas de entre S53, S61, T159 y T169 del polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3. Las modificaciones de ejemplo que eliminan un sitio de glicosilación N incluyen aquellas seleccionadas de entre modificaciones que corresponden a los reemplazos de aminoácidos S53A, S61A, T159A y T169A.

También se proporcionan polipéptidos FIX modificados de acuerdo con las reivindicaciones que contienen una o más modificaciones que introducen y/o eliminan uno o más sitios de sulfatación en comparación con el polipéptido FIX no modificado. En un ejemplo, los polipéptidos FIX modificados contienen una modificación que elimina un sitio de sulfatación en una posición de aminoácido que corresponde a la posición Y155 del polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3. Ejemplos de dichas modificaciones son aquellos que corresponden a los reemplazos de aminoácidos Y155H, Y155F y Y155Q.

Se proporcionan polipéptidos FIX modificados de acuerdo con las reivindicaciones que contienen una o más modificaciones que introducen y/o eliminan uno o más sitios de fosforilación en comparación con el polipéptido FIX no modificado. En un ejemplo, el polipéptido FIX modificado contiene una modificación que elimina un sitio de fosforilación en una posición de aminoácido que corresponde a la posición S 158 del polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3. Ejemplos de dichas modificaciones son aquellas que corresponden a los reemplazos de aminoácidos S158A, S158D y S158E. También se proporcionan polipéptidos FIX que contienen una o más modificaciones que introducen y/o eliminan uno o más sitios de β-hidroxilación en comparación con el polipéptido FIX no modificado. En un caso, los polipéptidos FIX modificados contienen una modificación que elimina un sitio de β-hidroxilación en una posición de aminoácido que corresponde a la posición D64 del polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3. Ejemplos de dichas modificaciones son aquellas que corresponden a los reemplazos de aminoácidos D64N y D64A.

Cualquiera de los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento pueden contener cualesquier otras mutaciones conocidas en la técnica, tal como, por ejemplo, una o más modificaciones seleccionadas de entre los reemplazos de aminoácidos Y1A, Y1C, Y1D, Y1E, Y1G, Y1H, Y1K, Y1N, Y1P, Y1Q, Y1R, Y1S, Y1T, S3T, K5A, K5I, K5L, K5F, K5E, L6A, L6C, L6D, L6E, L6G, L6H, L6K, L6N, L6P, L6Q, L6R, L6S, L6T, L6M, F9A, F9C, F9D, F9E, F9G, F9H, F9K, F9N, F9P, F9Q, F9R, F9S, F9T, F9I, F9M, F9W, V10A, V10C, V10D, V10E, V10G, V10H, V10K, V10N, V10P, V10Q, V10R, V10S, V10T, V10F, V10I, V10K, V10M, V10W, V10Y, Q11E, Q11D, Q11A, Q11C, Q11G, Q11P, G12D, G12E, G12G, G12H, G12K, G12N, G12P, G12Q, G12R, G12S, G12T, N13A, N13C, N13G, N13H, N13P, N13T, L14A, L14C, L14D, L14E, L14G, L14H, L14K, L14N, L14P, L14Q, L14R, L14S, L14T, L14F, L14I, L14M, L14V, L14W, L14Y, E15D, E15H, E15P, R16E, R16A, R16C, R16G, R16P, R16T, E17A, E17C, E17G, E17P, E17T, C18D, C18E, C18G, C18H, C18K, C18N, C18P, C18Q, C18R, C18S, C18T, M19A, M19C, M19D, M19E, M19G, M19H, M19K, M19N, M19P, M19Q, M19R, M19S, M19T, M19F, M19I, M19M, M19V, M19W, M19Y, E20A, E20C, E20G, E20P, E20T, E21A, E21C, E21G, E21P, K22H, K22P, K22T, S24H, S24P, F25A, F25C, F25D, F25E, F25G, F25H, F25K, F25N, F25P, F25Q, F25R, F25S, F25T, F25I, F25M, F25W, F25Y, E26A, E26C, E26G, E26P, E27A, E27C, E27G, E27H, E27P, E27S, E27T, A28C, A28D, A28E, A28G, A28H, A28K, A28N, A28P, A28Q, A28R, A28S, A28T, R29A, R29C, R29G, R29P, R29F, E30D, E30H, E30P, V31A, V31C, V31D, V31E, V31G, V31H, V31K, V31N, V31P, V31Q, V31R, V31S, V31T, V31F, V31I, V31W, V31Y, F32A, F32C, F32D, F32E, F32G, F32H, F32K, F32N, F32P, F32Q, F32R, F32S, F32T, E33H, E33N, E33P, E33Q, E33S, E33T, N34E, N34D, N34F, N34I, N34L, T35D, T35E, T35A, T35C, T35G, T35P, F41A, F41C, F41D, F41E, F41G, F41H, F41K, F41N, F41P, F41Q, F41R, F41S, F41T, F41M, F41W, F41Y, W42A, W42C, W42D, W42E, W42G, W42H, W42K, W42N, W42P, W42Q, W42R, W42S, W42T, K43A, K43C, K43G, K43P, Q44P, Q44T, Q44, Y45A, Y45C, Y45D, Y45E, Y45G, Y45H, Y45K, Y45N, Y45P, Y45Q, Y45R, Y45S, Y45T, V46A, V46C, V46D, V46E, V46G, V46H, V46K, V46N, V46P, V46Q, V46R, V46S, V46T, V46F, V46I, V46M, V46W, V46Y, D47A, D47C, D47G, D47H, D47P, D47T, G48D, G48E, G48P, G48T, D49H, D49P, D49Q, D49T, Q50A, Q50C, Q50D, Q50G, Q50H, Q50P, Q50T, C51D, C51E, C51G, C51H, C51K, C51N, C51P, C51Q, C51R, C51S, C51T, E52P, E52T, S53A, S53C, S53G, S53H, S53P, S53T, N54H, N54P, N54T, L57A, L57C, L57D, L57E, L57G, L57H, L57K, L57N, L57P, L57Q, L57R, L57S, L57T, L57F, L57I, L57M, L57W, L57Y, G60C, G60D, G60H, G60P, G60T, C62D, C62H, C62P, K63T, D65H, D65T, I66A, I66C, I66D, I66E, I66G, I66H, I66K, I66N, I66P, I66Q, I66R, I66S, I66T, I66M, I66W, I66Y, Y69A, Y69C, Y69D, Y69E, Y69G, Y69H, Y69K, Y69N, Y69P, Y69Q, Y69R, Y69S, Y69T, C71H, C71P, W72A, W72C, W72D, W72E, W72G, W72H, W72K, W72N, W72P, W72Q, W72R, W72S, W72T, W72I, W72Y, F75A, F75C, F75D, F75E, F75G, F75H, F75K, F75N, F75P, F75Q, F75R, F75S, F75T, F77A, F77C, F77D, F77E, F77G, F77H, F77K, F77N, F77P, F77Q, F77R, F77S, F77T, L84A, L84C, L84D, L84E, L84G, L84H, L84K, L84N, L84P, L84Q, L84R, L84S, L84T, L84M, L84W, L84Y, V86I, V86L, V86M, V86F, V86W, V86Y, V86A, V86C, V86D, V86E, V86G, V86H, V86K, V86N, V86P, V86Q, V86R, V86S, V86T, I90A, I90C, I90D, I90E, I90G, I90H, I90K, I90N, I90P, I90Q, I90R, I90S, I90T, I90M, I90W, K91A, K91C, K91G, K91P, N92A, N92C, N92G, N92P, N92T, G93D, G93E, G93H, G93K, G93N, G93P, G93Q, G93R, G93S, G93T, R94A, R94C, R94G, R94P, C95D, C95E, C95G, C95H, C95K, C95N, C95P, C95Q, C95R, C95S, C95T, E96P, E96T, Q97A, Q97C, Q97G, Q97P, F98A, F98C, F98D, F98E, F98G, F98H, F98K, F98N, F98P, F98Q, F98R, F98S, F98T, F98M, F98W, F98Y, K100A, K100C, K100G, K100P, N101H, N101T, A103D, A103E, A103H, A103K, A103N, A103P, A103Q, A103R, A103S, A103T, D104T, K106H, K106P, K106T, V107A, V107C, V107D, V107E, V107G, V107H, V107K, V107N, V107P, V107Q, V107R, V107S, V107T, V108A, V108C, V108D, V108E, V108G, V108H, V108K, V108N, V108P, V108Q, V108R, V108S, V108T, V108F, V108M, V108W, V108Y, S110A, S110C, S110G, SHOP, C111D, C111E, C111H, C111K, C111N, C111P, C111Q, C111R, C111S, C111T, T112A, T112C, T112G, T112P, E113D, E113H, E113P, G114D, G114E, G114H, G114K, G114N, G114P, G114Q, G114R, G114S, G114T, Y115A, Y115C, Y115D, Y115E, Y115G, Y115H, Y115K, Y115N, Y115P, Y115Q, Y115R, Y115S, Y115T, Y115M, Y115W, R116P, R116T, L117A, L117C, L117D, L117E, L117G, L117H, L117K, L117N, L117P, L117Q, L117R, L117S, L117T, A118D, A118E, A118H, A118K, A118N, A118P, A118Q, A118R, A118S, A118T, N120D, N120H, N120P, Q121T,

S123H, S123T, V128A, V128C, V128D, V128E, V128G, V128H, V128K, V128N, V128P, V128Q, V128R, V128S, V128T, F130A, F130C, F130D, F130E, F130G, F130H, F130K, F130N, F130P, F130Q, F130R, F130S, F130T, V135A, V135C, V135D, V135E, V135G, V135H, V135K, V135N, V135P, V135Q, V135R, V135S, V135T, V135W, V135Y, V137A, V137C, V137D, V137E, V137G, V137H, V137K, V137N, V137P, V137Q, V137R, V137S, V137T, V137M, V137W, V137Y, S138H, S138T, T140D, T140H, S141T, K142H, K142P, L143A, L143C, L143D, L143E, L143G, L143H, L143K, L143N, L143P, L143Q, L143R, L143S, L143T, L143F, L143I, L143M, L143V, L143W, L143Y, R145H, R145P, R145T, A146P, A146T, T148H, T148P, V149A, V149C, V149D, V149E, V149G, V149H, V149K, V149N, V149P, V149Q, V149R, V149S, V149T, V149F, V149I, V149M, V149W, V149Y, F150A, F150C, F150D, F150E, F150G, F150H, F150K, F150N, F150P, F150Q, F150R, F150S, F150T, F150M, F150W, F150Y, D152A, D152C, D152G, D152P, D152S, D152T, V153A, V153C, V153D, V153E, V153G, V153H, V153K, V153N, V153P, V153Q, V153R, V153S, V153T, V153F, V153I, V153M, V153W, V153Y, D154A, D154C, D154G, D154P, D154Q, D154S, Y155A, Y155C, Y155D, Y155E, Y155G, Y155H, Y155K, Y155N, Y155P, Y155Q, Y155R, Y155S, Y155T, Y155M, Y155V, Y155W, V156A, V156C, V156D, V156E, V156G, V156H, V156K, V156N, V156P, V156Q, V156R, V156S, V156T, V156I, V156M, V156W, V156Y, N157A, N157C, N157G, N157H, N157P, N157Q, N157T, S158H, S158P, S158T, T159A, T159C, T159G, T159P, E160A, E160C, E160G, E160P, A161C, A161D, A161E, A161H, A161K, A161N, A161P, A161Q, A161R, A161S, A161T, E162P, E162T, T163A, T163C, T163G, T163P, I164A, I164C, I164D, I164E, I164G, I164H, I164K, I164N, I164P, I164Q, I164R, I164S, I164T, L165A, L165C, L165D, L165E, L165G, L165H, L165K, L165N, L165P, L165Q, L165R, L165S, L165T, L165M, L165W, L165Y, I168A, I168C, I168D, I168E, I168G, I168H, I168K, I168N, I168P, I168Q, I168R, I168S, I168T, F175A, F175C, F175D, F175E, F175G, F175H, F175K, F175N, F175P, F175Q, F175R, F175S, F175T, F178A, F178C, F178D, F178E, F178G, F178H, F178K, F178N, F178P, F178Q, F178R, F178S, F178T, F178M, F178W, F178Y, T179A, T179C, T179G, T179P, R180A, R180C, R180D, R180G, R180H, R180P, V181A, V181C, V181D, V181E, V181G, V181H, V181K, V181N, V181P, V181Q, V181R, V181S, V181T, V181F, V181I, V181M, V181W, V181Y, V182A, V182C, V182D, V182E, V182G, V182H, V182K, V182N, V182P, V182Q, V182R, V182S, V182T, V182F, V182I, V182M, V182W, V182Y, G183D, G183E, G183H, G183K, G183N, G183P, G183Q, G183S, G183T, G184D, G184E, G184H, G184K, G184N, G184P, G184Q, G184R, G184S, G184T, E185A, E185C, E185G, E185H, E185P, E185T, D186A, D186C, D186G, D186H, D186P, D186T, A187C, A187D, A187E, A187G, A187H, A187K, A187N, A187P, A187Q, A187R, A187S, A187T, K188A, K188C, K188G, K188H, K188P, K188T, G190D, G190E, G190H, G190K, G190N, G190P, G190Q, G190R, G190S, G190T, F192A, F192C, F192D, F192E, F192G, F192H, F192K, F192N, F192P, F192Q, F192R, F192S, F192T, F192W, F192Y, W194A, W194C, W194D, W194E, W194G, W194H, W194K, W194N, W194P, W194Q, W194R, W194S, W194T, Q195H, Q195P, Q195T, V196A, V196C, V196D, V196E, V196G, V196H, V196K, V196N, V196P, V196Q, V196R, V196S, V196T, V196F, V196I, V196M, V196W, V196Y, V197A, V197C, V197D, V197E, V197G, V197H, V197K, V197N, V197P, V197Q, V197R, V197S, V197T, V197F, V197I, V197M, V197W, V197Y, L198A, L198C, L198D, L198E, L198G, L198H, L198K, L198N, L198P, L198Q, L198R, L198S, L198T, L198I, L198Y, N199A, N199C, N199G, N199H, N199P, N199S, N199T, G200P, G200T, K201A, K201C, K201D, K201E, K201G, K201H, K201N, K201P, K201Q, K201S, K201T, V202A, V202C, V202D, V202E, V202G, V202H, V202K, V202N, V202P, V202Q, V202R, V202S, V202T, V202F, V202I, V202M, V202W, V202Y, D203A, D203C, D203G, D203P, D203T, A204C, A204D, A204E, A204G, A204H, A204K, A204N, A204P, A204Q, A204R, A204S, A204T, F205A, F205C, F205D, F205E, F205G, F205H, F205K, F205N, F205P, F205Q, F205R, F205S, F205T, F205M, F205V, F205W, F205Y, G207H, G207P, G208C, G208D, G208E, G208H, G208K, G208N, G208P, G208Q, G208R, G208S, G208T, S209A, S209C, S209G, S209P, I210A, I210C, I210D, I210E, I210G, I210H, I210K, I210N, I210P, I210Q, I210R, I210S, I210T, I210F, I210W, I210Y, V211A, V211C, V211D, V211E, V211G, V211H, V211K, V211N, V211P, V211Q, V211R, V211S, V211T, V211F, V211I, V211M, V211W, N212A, N212C, N212G, N212P, E213H, E213P, E213S, E213T, K214T, W215A, W215C, W215D, W215E, W215G, W215H, W215K, W215N, W215P, W215Q, W215R, W215S, W215T, I216A, I216C, I216D, I216E, I216G, I216H, I216K, I216N, I216P, I216Q, I216R, I216S, I216T, V217A, V217C, V217D, V217E, V217G, V217H, V217K, V217N, V217P, V217Q, V217R, V217S, V217T, V217I, V217Y, A219H, A219P, A219T, V223A, V223C, V223D, V223E, V223G, V223H, V223K, V223N, V223P, V223Q, V223R, V223S, V223T, V223M, V223W, V223Y, G226P, V227A, V227C, V227D, V227E, V227G, V227H, V227K, V227N, V227P, V227Q, V227R, V227S, V227T, V227F, V227I, V227M, V227W, V227Y, K228A, K228C, K228G, K228H, K228P, I229A, I229C, I229D, I229E, I229G, I229H, I229K, I229N, I229P, I229Q, I229R, I229S, I229T, I229M, I229W, I229Y, T230A, T230C, T230G, T230P, V231A, V231C, V231D, V231E, V231G, V231H, V231K, V231N, V231P, V231Q, V231R, V231S, V231T, V232A, V232C, V232D, V232E, V232G, V232H, V232K, V232N, V232P, V232Q, V232R, V232S, V232T, V232F, V232I, V232M, V232W, V232Y, A233C, A233D, A233E, A233G, A233H, A233K, A233N, A233P, A233Q, A233R, A233S, A233T, A233V, G234D, G234E, G234H, G234K, G234N, G234P, G234Q, G234R, G234S, G234T, E235H, E235N, E235P, E235Q, E235S, E235T, H236A, H236C, H236G, H236P, N237A, N237C, N237G, N237P, N237T, I238A, I238C, I238D, I238E, I238G, I238H, I238K, I238N, I238P, I238Q, I238R, I238S, I238T, E239A, E239C, E239G, E239P, E240H, E240T, V250A, V250C, V250D, V250E, V250G, V250H, V250K, V250N, V250P, V250Q, V250R, V250S, V250T, V250M, V250W, V250Y, I251A, I251C, I251D, I251E, I251G, I251H, I251K, I251N, I251P, I251Q, I251R, I251S, I251T, I253A, I253C, I253D, I253E, I253G, I253H, I253K, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253M, I253W, I253Y, I254A, I254C, I254D, I254E, I254G, I254H, I254K, I254N, I254P, I254Q, I254R, I254S, I254T, P255H, H256P, H256T, H257A, H257C, H257G, H257P, N258P, N258T, Y259A, Y259C, Y259D, Y259E, Y259G, Y259H, Y259K, Y259N, Y259P, Y259Q, Y259R, Y259S, Y259T, Y259M, Y259W, Y259F, N260A, N260C, N260G, N260P, A261D, A261E, A261H, A261K, A261N, A261P, A261Q, A261R, A261S, A261T, A262C, A262D, A262E, A262G, A262H, A262K, A262N, A262P, A262Q, A262R, A262S, A262T, I263A, I263C, I263D, I263E, I263G, I263H, I263K, I263N, I263P, I263Q, I263R, I263S, I263T, I263M, I263V, I263W, I263Y, N264A, N264C, N264D, N264G, N264H, N264P, K265A, K265C, K265G, K265H, K265P, K265T, Y266A, Y266C, Y266D, Y266E, Y266G, Y266H, Y266K, Y266N, Y266P, Y266Q, Y266R, Y266S, Y266T, Y266M, Y266W, N267A, N267C, N267G, N267H, N267P, N267T, H268P, D269A, D269C, D269E,

D269G, D269H, D269N, D269P, D269Q, D269S, D269T, I270A, I270C, I270D, I270E, I270G, I270H, I270K, I270N, I270P, I270Q, I270R, I270S, I270T, I270M, I270W, A271C, A271D, A271E, A271G, A271H, A271K, A271N, A271P, A271Q, A271R, A271S, A271T, L272A, L272C, L272D, L272E, L272G, L272H, L272K, L272N, L272P, L272Q, L272R, L272S, L272T, L272F, L273A, L273C, L273D, L273E, L273G, L273H, L273K, L273N, L273P, L273Q, L273R, L273S, L273T, L273F, L273I, L273M, L273V, L273W, L273Y, E274A, E274C, E274G, E274P, E274T, L275A, L275C, L275D, L275E, L275G, L275H, L275K, L275N, L275P, L275Q, L275R, L275S, L275T, L275W, L275Y, D276P, D276S, D276T, E277A, E277C, E277G, E277P, E277V, E277N, E277D, E277E, E277Q, E277H, E277I, E277L, E277M, E277F, E277S, E277T, E277W, E277Y, P278T, L279A, L279C, L279D, L279E, L279G, L279H, L279K, L279N, L279P, L279Q, L279R, L279S, L279T, L279I, L279Y, V280A, V280C, V280D, V280E, V280G, V280H, V280K, V280N, V280P, V280Q, V280R, V280S, V280T, V280F, V280I, V280W, V280Y, L281A, L281C, L281D, L281E, L281G, L281H, L281K, L281N, L281P, L281Q, L281R, L281S, L281T, L281F, L281I, L281V, L281W, L281Y, S283A, S283C, S283G, S283P, Y284A, Y284C, Y284D, Y284E, Y284G, Y284H, Y284K, Y284N, Y284P, Y284Q, Y284R, Y284S, Y284T, Y284M, V285A, V285C, V285D, V285E, V285G, V285H, V285K, V285N, V285P, V285Q, V285R, V285S, V285T, V285M, V285W, V285Y, T286A, T286C, T286G, T286P, I288A, I288C, I288D, I288E, I288G, I288H, I288K, I288N, I288P, I288Q, I288R, I288S, I288T, C289D, C289H, C289P, I290A, I290C, I290D, I290E, I290G, I290H, I290K, I290N, I290P, I290Q, I290R, I290S, I290T, I290Y, A291D, A291E, A291H, A291K, A291N, A291P, A291Q, A291R, A291S, A291T, D292A, D292C, D292G, D292P, D292T, K293H, K293P, K293T, Y295A, Y295C, Y295D, Y295E, Y295G, Y295H, Y295K, Y295N, Y295P, Y295Q, Y295R, Y295S, Y295T, Y295W, T296A, T296C, T296G, T296P, N297A, N297C, N297G, N297P, I298A, I298C, I298D, I298E, I298G, I298H, I298K, I298N, I298P, I298Q, I298R, I298S, I298T, F299A, F299C, F299D, F299E, F299G, F299H, F299K, F299N, F299P, F299Q, F299R, F299S, F299T, L300A, L300C, L300D, L300E, L300G, L300H, L300K, L300N, L300P, L300Q, L300R, L300S, L300T, L300F, L300I, L300M, L300V, L300W, L300Y, K301A, K301C, K301G, K301P, K301T, F302A, F302C, F302D, F302E, F302G, F302H, F302K, F302N, F302P, F302Q, F302R, F302S, F302T, G303H, G303P, G303T, S304A, S304C, S304G, S304P, S304T, G305D, G305E, G305H, G305N, G305P, G305Q, G305S, G305T, Y306A, Y306C, Y306D, Y306E, Y306G, Y306H, Y306K, Y306N, Y306P, Y306Q, Y306R, Y306S, Y306T, V307A, V307C, V307D, V307E, V307G, V307H, V307K, V307N, V307P, V307Q, V307R, V307S, V307T, S308P, S308T, W310A, W310C, W310D, W310E, W310G, W310H, W310K, W310N, W310P, W310Q, W310R, W310S, W310T, G311H, V313A, V313C, V313D, V313E, V313G, V313H, V313K, V313N, V313P, V313Q, V313R, V313S, V313T, F314A, F314C, F314D, F314E, F314G, F314H, F314K, F314N, F314P, F314Q, F314R, F314S, F314T, F314M, F314W, F314Y, H315A, H315C, H315G, H315P, K316A, K316C, K316G, K316P, G317C, G317D, G317E, G317H, G317K, G317N, G317P, G317Q, G317R, G317S, G317T, S319D, S319H, S319N, S319P, S319Q, A320C, A320D, A320E, A320G, A320H, A320K, A320N, A320P, A320Q, A320R, A320S, A320T, L321A, L321C, L321D, L321E, L321G, L321H, L321K, L321N, L321P, L321Q, L321R, L321S, L321T, V322A, V322C, V322D, V322E, V322G, V322H, V322K, V322N, V322P, V322Q, V322R, V322S, V322T, V322W, V322Y, L323A, L323C, L323D, L323E, L323G, L323H, L323K, L323N, L323P, L323Q, L323R, L323S, L323T, L323F, L323I, L323M, L323V, L323W, L323Y, Q324A, Q324C, Q324G, Q324P, Y325A, Y325C, Y325D, Y325E, Y325G, Y325H, Y325K, Y325N, Y325P, Y325Q, Y325R, Y325S, Y325T, Y325W, L326A, L326C, L326D, L326E, L326G, L326H, L326K, L326N, L326P, L326Q, L326R, L326S, L326T, L326F, L326I, L326M, L326V, L326W, L326Y, R327A, R327C, R327G, R327H, R327P, V328A, V328C, V328D, V328E, V328G, V328H, V328K, V328N, V328P, V328Q, V328R, V328S, V328T, V328F, V328I, V328M, V328W, V328Y, L330A, L330C, L330D, L330E, L330G, L330H, L330K, L330N, L330P, L330Q, L330R, L330S, L330T, L330F, L330I, L330V, L330W, L330Y, V331A, V331C, V331D, V331E, V331G, V331H, V331K, V331N, V331P, V331Q, V331R, V331S, V331T, V331F, V331I, V331M, V331W, V331Y, D332A, D332C, D332G, D332P, R333A, R333C, R333D, R333E, R333G, R333H, R333N, R333P, R333Q, R333R, R333S, R333T, A334C, A334D, A334E, A334G, A334H, A334K, A334N, A334P, A334Q, A334R, A334S, A334T, T335A, T335C, T335G, T335P, C336D, C336E, C336H, C336K, C336N, C336P, C336Q, C336R, C336S, C336T, L337A, L337C, L337D, L337E, L337G, L337H, L337K, L337N, L337P, L337Q, L337R, L337S, L337T, R338A, R338E, R338V, R338T, R338C, R338G, R338P, R338I, R338F, R338W, R338S, S339P, S339T, K341A, K341C, K341G, K341P, F342A, F342C, F342D, F342E, F342G, F342H, F342K, F342N, F342P, F342Q, F342R, F342S, F342T, F342M, F342W, T343A, T343C, T343G, T343P, I344A, I344C, I344D, I344E, I344G, I344H, I344K, I344N, I344P, I344Q, I344R, I344S, I344T, Y345F, Y345A, Y345C, Y345D, Y345E, Y345G, Y345H, Y345K, Y345N, Y345P, Y345Q, Y345R, Y345S, Y345T, Y345M, Y345W, N346A, N346C, N346G, N346P, N347H, N347P, M348A, M348C, M348D, M348E, M348G, M348H, M348K, M348N, M348P, M348Q, M348R, M348S, M348T, F349A, F349C, F349D, F349E, F349G, F349H, F349K, F349N, F349P, F349Q, F349R, F349S, F349T, F349I, F349M, F349W, F349Y, C350D, C350H, C350P, C350T, A351E, A351H, A351N, A351P, A351Q, A351R, A351S, A351T, G352A, G352C, G352P, F353A, F353C, F353D, F353E, F353G, F353H, F353K, F353N, F353P, F353Q, F353R, F353S, F353T, F353I, F353M, F353W, H354A, H354C, H354G, H354P, E355A, E355C, E355D, E355G, E355H, E355K, E355N, E355P, E355Q, E355S, E355T, G356D, G356E, G356H, G356K, G356N, G356P, G356Q, G356R, G356S, G356T, G357D, G357E, G357H, G357K, G357N, G357P, G357Q, G357R, G357S, G357T, R358D, R358E, R358H, R358K, R358N, R358P, R358Q, R358R, R358S, R358T, D359A, D359C, D359G, D359P, D359Q, D359S, D359T, S360A, S360C, S360G, S360P, C361D, C361E, C361H, C361K, C361N, C361P, C361Q, C361R, C361S, C361T, V370A, V370C, V370D, V370E, V370G, V370H, V370K, V370N, V370P, V370Q, V370R, V370S, V370T, V370W, V370Y, V373A, V373C, V373D, V373E, V373G, V373H, V373K, V373N, V373P, V373Q, V373R, V373S, V373T, V373F, V373I, V373M, V373W, E374A, E374C, E374G, E374P, G375H, S377A, S377C, S377G, S377P, F378A, F378C, F378D, F378E, F378G, F378H, F378K, F378N, F378P, F378Q, F378R, F378S, F378T, F378W, L379A, L379C, L379D, L379E, L379G, L379H, L379K, L379N, L379P, L379Q, L379R, L379S, L379T, L379I, L379M, L379W, L379Y, T380A, T380C, T380G, T380P, G381D, G381E, G381H, G381K, G381N, G381P, G381Q, G381R, G381S, G381T, I382A, I382C, I382D, I382E, I382G, I382H, I382K, I382N, I382P, I382Q, I382R, I382S, I382T, I382M, I382W, I382Y, I383A, I383C, I383D, I383E, I383G, I383H, I383K, I383N, I383P, I383Q, I383R, I383S, I383T, I383V, S384A, S384C, S384G, S384P, W385A,

W385C, W385D, W385E, W385G, W385H, W385K, W385N, W385P, W385Q, W385R, W385S, W385T, W385M, E387A, E387C, E387G, E387H, E387P, E387T, E388H, E388N, E388G, E388P, E388Q, E388T, A390C, A390D, A390E, A390G, A390H, A390K, A390N, A390P, A390Q, A390R, A390S, M391A, M391C, M391D, M391E, M391G, M391H, M391K, M391N, M391P, M391Q, M391R, M391S, M391T, M391F, M391I, M391W, M391Y, K392A, K392C, K392G, K392P, G393C, G393D, G393E, G393H, G393K, G393N, G393P, G393Q, G393R, G393S, G393T, Y395A, Y395C, Y395D, Y395E, Y395G, Y395H, Y395K, Y395N, Y395P, Y395Q, Y395R, Y395S, Y395T, Y398A, Y398C, Y398D, Y398E, Y398G, Y398H, Y398K, Y398N, Y398P, Y398Q, Y398R, Y398S, Y398T, K400H, V401A, V401C, V401D, V401E, V401G, V401H, V401K, V401N, V401P, V401Q, V401R, V401S, V401T, V401F, V401I, V401M, V401W, V401Y, S402A, S402C, S402G, S402P, R403A, R403C, R403G, R403P, R403T, Y404A, Y404C, Y404D, Y404E, Y404G, Y404H, Y404K, Y404N, Y404P, Y404Q, Y404R, Y404S, Y404T, V405A, V405C, V405D, V405E, V405G, V405H, V405K, V405N, V405P, V405Q, V405R, V405S, V405T, V405W, V405Y, N406F, N406H, N406I, N406L, N406P, N406W, N406Y, W407D, W407E, W407F, W407H, W407I, W407K, W407N, W407P, W407Q, W407R, W407S, W407T, W407Y, I408D, I408E, I408H, I408K, I408N, I408P, I408Q, I408R, I408S, I408T, K409F, K409H, K409I, K409P, K409T, K409V, K409W, K409Y, E410H, K411A, K411C, K411G, K411I, K411P, K411T, K411V, K411W, K411Y, K413T, Y1I, S3Q, S3H, S3N, G4Q, G4H, G4N, K5N, K5Q, L6I, L6V, E7Q, E7H, E7N, E8Q, E8H, E8N, F9V, E15Q, E15N, R16H, R16Q, E17Q, E17H, E17N, E20Q, E20H, E20N, E21Q, E21H, E21N, K22N, K22Q, S24Q, S24N, F25V, E26Q, E26H, E26N, E27Q, E27N, R29H, R29Q, E30Q, E30N, F32I, F32V, T35Q, T35H, T35N, E36Q, E36H, E36N, R37H, R37Q, T38Q, T38H, T38N, T39Q, T39H, T39N, E40Q, E40H, E40N, F41I, F41V, K43N, K43Q, Y45I, D47N, D47Q, G48Q, G48H, G48N, D49N, E52Q, E52H, E52N, S53Q, S53N, P55A, P55S, L57V, N58Q, N58S, G59Q, G59H, G59N, G60Q, G60N, S61Q, S61H, S61N, K63N, K63Q, D64N, D64Q, D65N, D65Q, S68Q, S68H, S68N, Y69I, E70Q, E70H, E70N, P74A, P74S, F75I, F75V, G76Q, G76H, G76N, F77I, F77V, E78Q, E78H, E78N, G79Q, G79H, G79N, K80N, K80Q, E83Q, E83H, E83N, L84I, L84V, D85N, D85Q, T87Q, T87H, T87N, K91N, K91Q, N92Q, N92S, R94H, R94Q, E96Q, E96H, E96N, F98I, F98V, K100N, K100Q, S102Q, S102H, S102N, D104N, D104Q, K106N, K106Q, S110Q, S110H, S110N, T112Q, T112H, T112N, E113Q, E113N, Y115I, R116H, R116Q, L117I, L117V, E119Q, E119H, E119N, K122N, K122Q, S123Q, S123N, E125Q, E125H, E125N, P126A, P126S, A127Q, A127H, A127N, P129A, P129S, P131A, P131S, G133Q, G133H, G133N, R134H, R134Q, S136Q, S136H, S136N, S138Q, S138N, T140Q, T140N, S141Q, S141H, S141N, K142N, K142Q, T144Q, T144H, T144N, R145Q, A146Q, A146H, A146N, E147Q, E147H, E147N, T148Q, T148N, P151A, P151S, D152N, D152Q, D154N, Y155I, S158Q, S158N, T159Q, T159H, T159N, E160Q, E160H, E160N, E162Q, E162H, E162N, T163Q, T163H, T163N, L165I, L165V, D166N, D166Q, T169Q, T169H, T169N, S171Q, S171H, S171N, T172Q, T172H, T172N, S174Q, S174H, S174N, F175I, F175V, D177N, D177Q, F178I, F178V, T179Q, T179H, T179N, R180Q, E185Q, E185N, D186N, D186Q, K188N, K188Q, P189A, P189S, F192I, F192V, F192IH, P193A, P193S, W194I, L198V, N199Q, G200Q, G200H, G200N, D203N, D203Q, F205I, G207Q, G207N, S209Q, S209H, S209N, E213Q, E213N, K214N, K214Q, T218Q, T218H, T218N, A219Q, A219N, A220Q, A220H, A220N, E224Q, E224H, E224N, T225Q, T225H, T225N, G226Q, G226H, G226N, K228N, K228Q, T230Q, T230H, T230N, E239Q, E239H, E239N, E240Q, E240N, T241Q, T241H, T241N, E242Q, E242H, E242N, T244Q, T244H, T244N, E245Q, E245H, E245N, K247N, K247Q, R248H, R248Q, R252H, R252Q, P255A, P255S, Y259I, K265N, K265Q, Y266I, L272I, L272V, E274Q, E274H, E274N, L275I, L275V, D276N, D276Q, E277Q, E277H, E277N, P278A, P278S, L279V, S283Q, S283H, S283N, Y284I, T286Q, T286H, T286N, P287A, P287S, D292N, D292Q, K293N, K293Q, E294Q, E294H, E294N, Y295I, T296Q, T296H, T296N, F299I, F299V, K301N, K301Q, F302I, F302V, G303Q, G303N, S304Q, S304H, S304N, Y306I, S308Q, S308H, S308N, G309Q, G309H, G309N, G311Q, G311N, R312H, R312Q, F314I, F314V, K316N, K316Q, L321I, L321V, Y325I, R327Q, P329A, P329S, D332N, D332Q, T335Q, T335H, T335N, L337I, L337V, R338H, R338Q, S339Q, S339H, S339N, T340Q, T340H, T340N, K341N, K341Q, F342I, F342V, T343Q, T343H, T343N, Y345I, M348I, M348V, F349V, G352Q, G352H, G352N, F353V, D359N, S360Q, S360H, S360N, G363Q, G363H, G363N, D364N, D364Q, S365Q, S365H, S365N, G366Q, G366H, G366N, G367Q, G367H, G367N, P368A, P368S, T371Q, T371H, T371N, E372Q, E372H, E372N, E374Q, E374H, E374N, G375Q, G375N, T376Q, T376H, T376N, S377Q, S377H, S377N, F378I, F378V, L379V, T380Q, T380H, T380N, S384Q, S384H, S384N, G386Q, G386H, G386N, E387Q, E387N, M391V, K392N, K392Q, K394N, K394Q, Y395I, G396Q, G396H, G396N, I397Q, I397H, I397N, Y398I, T399Q, T399H, T399N, K400N, K400Q, S402Q, S402H, S402N, R403H, R403Q, Y404I, K409N, K409Q, E410Q, E410N, K411N, K411Q, T412Q, T412H, T412N, K413N, K413Q, L414I, L414V, T415Q, T415H, T415N, R252A, H268A, K293A, K400A, R403A, R403E y K411A.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento exhiben aumento de la actividad procoagulante en comparación con el polipéptido FIX no modificado, tal como, por ejemplo, al menos o aproximadamente 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 que la actividad procoagulante de un polipéptido FIX no modificado.

En algunos ejemplos, el polipéptido FIX no modificado tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3. De esta manera, se proporcionan en este documento polipéptidos FIX modificados que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 121, 122, 152, 153, 156, 161, 166, 169-173, 188, 219-226, 232-244, 249-258, 260, 264-267, 326-331, 333, 334, 336-341, 342, 345-350, 353-360, 366, 368, 369, 372-375, 378-381, 383-386, 393-395, 397, 398, 403-408, 410 y 411.

En algunos casos, los polipéptidos FIX modificados proporcionados son polipéptidos humanos. En otros casos, son polipéptidos no humanos. En ejemplos adicionales, los polipéptidos FIX modificados son polipéptidos maduros. También se proporcionan polipéptidos FIX de cadena sencilla y de dos cadenas, y polipéptidos FIX activos o activados. En

algunos ejemplos, la activación se efectúa mediante división proteolítica por el Factor IX (FIXa) o el complejo Factor de Tejido/Factor VIIa.

En algunos ejemplos, los polipéptidos FIX modificados proporcionados tienen solo la secuencia primaria modificada. En otros ejemplos, está contenida una modificación química o una modificación postraduccional (por ejemplo, los polipéptidos FIX modificados se glicosilan, carboxilan, hidroxilan, sulfatan, fosforilan, albuminan, o conjugan a una fracción de polietilenglicol (PEG)). También se proporcionan polipéptidos FIX quiméricos y de fusión.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones, siempre y cuando el polipéptido retenga al menos una actividad FIX (actividad coagulante) del polipéptido FIX no modificado. Por ejemplo, el polipéptido FIX modificado puede retener al menos aproximadamente o 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más de una actividad del polipéptido FIX no modificado. Las actividades que se retienen se aumentan en comparación con el polipéptido FIX no modificado.

Se proporcionan en este documento moléculas de ácido nucleicos que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos FIX modificados proporcionados. También se proporcionan vectores que contienen las moléculas de ácido nucleicos. El vector puede ser, por ejemplo, un vector procariota, vector viral (por ejemplo, un adenovirus, un virus asociado a adeno, un retrovirus, un virus herpes, un lentivirus, un poxvirus, o un citomegalovirus), o un vector eucariota (por ejemplo, un vector de mamífero). También se proporcionan células que contienen estos vectores. La célula puede ser, por ejemplo, una célula eucariota, tal como una célula de mamífero (por ejemplo, células de riñón de hámster bebé (BHK-21) o células 293 o células CHO). Normalmente, la célula expresa el polipéptido FIX modificado. De esta manera, también se proporcionan polipéptidos FIX modificados que son producidos por cualquiera de las células proporcionadas en este documento.

Se proporcionan composiciones farmacéuticas, que contienen una concentración o cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido FIX modificado proporcionado en este documento, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica se formula para administración local, sistémica o tópica, tal como administración oral, nasal, pulmonar, bucal, transdérmica, subcutánea, intraduodenal, entérica, parenteral, intravenosa, o intramuscular. En ejemplos adicionales, se formula para liberación controlada o para administración de dosificación única.

Se proporcionan polipéptidos FIX modificados de acuerdo con la invención para uso en los métodos en los que un sujeto se trata al administrar las composiciones farmacéuticas proporcionadas, en el que el sujeto tiene una enfermedad o afección que se trata mediante administración de FIX o un procoagulante. En algunos casos, la enfermedad o afección se trata mediante la administración de FIX activo (FIXa) o FIX que no está activado. En algunos ejemplos, el tratamiento con la composición farmacéutica mejora o alivia los síntomas asociados con la enfermedad o afección. También se describen métodos que contienen una etapa para monitorear al sujeto en busca de cambios en los síntomas asociados con la enfermedad o afección que se trata mediante la administración de FIX o un procoagulante.

La enfermedad o afección que se va a tratar se puede seleccionar entre trastornos de coagulación de la sangre, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilias y trastornos hemorrágicos. En algunos ejemplos, la hemofilia es hemofilia B. El tratamiento también puede implicar la administración de uno o más factores de coagulación adicionales, tal como, por ejemplo, factores de coagulación purificados por plasma o recombinantes, procoagulantes, tal como vitamina K, derivados de vitamina K e inhibidores de la proteína C, plasma, plaquetas, glóbulos rojos o corticosteroides.

También se describen artículos de fabricación, que contienen material de empaque y una composición farmacéutica que contiene un polipéptido FIX modificado contenido dentro del material de empaque. El polipéptido FIX modificado es efectivo para el tratamiento de una enfermedad tratable mediante la administración de FIX o un procoagulante, y el material de empaque incluye una etiqueta que indica que el polipéptido FIX modificado se utiliza para el tratamiento de una enfermedad tratable mediante la administración de FIX o un procoagulante.

Se describen kits que contienen cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, un dispositivo para la administración de la composición y, opcionalmente, también se describen instrucciones para administración.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa la cascada de coagulación. La figura muestra la ruta intrínseca y la ruta extrínseca de coagulación para la producción independiente de FXa y la convergencia de las rutas a una ruta común para generar trombina y fibrina para la formación de un coágulo. Estas vías están interconectadas. La figura representa el orden de las moléculas involucradas en la cascada de activación en la que un zimógeno se convierte en una proteasa activada mediante la división de uno o más enlaces peptídicos. La proteasa activada sirve entonces como la proteasa activadora para la próxima molécula de zimógeno en la cascada, lo que finalmente resulta en la formación de coágulos.

La figura 2 representa el modelo de coagulación basado en células (véase, por ejemplo, Hoffman et al. (2001) Thromb Haemost 85: 958-965). La figura representa los eventos de coagulación como separados en tres fases, donde el inicio de la coagulación se efectúa mediante la activación de FX a FXa por el complejo TF/FVIIa en la célula portadora de TF, lo que resulta en la generación de una pequeña cantidad de trombina después de la activación por FXa/FVa. La amplificación tiene lugar cuando la trombina se une a las plaquetas y las activa, e inicia la activación de cantidades suficientes de los factores de coagulación apropiados para formar los complejos FVIIIa/FIXa y FVa/FXa. La propagación de la coagulación ocurre en la superficie de un gran número de plaquetas activadas en el sitio de la lesión, lo que resulta en un estallido de generación de trombina que es lo suficientemente grande como para generar suficiente fibrina a partir del fibrinógeno para establecer un coágulo en el sitio de la lesión.

La Figura 3 es una alineación de diversos polipéptidos de Factor IX, incluidas las variantes de especies y los polipéptidos de Factor IX modificados (SEQ ID NOS: 2-5, 14, 20, 172, 267, 247, 325, 346-347, 360, 365-366, 406). También se incluyen la SEQ ID NO: 6 de la patente de los Estados Unidos número 7,700,734 que contiene las mutaciones V86A/E277A/R338A y la SEQ ID NO: 2 de la patente de los Estados Unidos número 7,125,841. Un "*" significa que los residuos o nucleótidos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en la alineación, un ":" significa que se han observado sustituciones conservadas y un "." significa que se han observado sustituciones semiconservadas.

estos vectores. La célula puede ser, por ejemplo, una célula eucariota, como una célula de mamífero (por ejemplo, células de riñón de hámster bebé (BHK-21) o células 293 o células CHO). Típicamente, la célula expresa el polipéptido FIX modificado. Por lo tanto, también se proporcionan polipéptidos FIX modificados que son producidos por cualquiera de las células proporcionadas en el presente documento.

Se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen una concentración o cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido FIX modificado proporcionado en este documento, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica está formulada para administración local, sistémica o tópica, tal como administración oral, nasal, pulmonar, bucal, transdérmica, subcutánea, intraduodenal, enteral, parenteral, intravenosa o intramuscular. En otros ejemplos, está formulado para liberación controlada o para administración de dosis única.

Se proporcionan métodos en los que un sujeto se trata mediante la administración de las composiciones farmacéuticas proporcionadas, en el que el sujeto tiene una enfermedad o afección que se trata mediante la administración de FIX o un procoagulante. En algunos casos, la enfermedad o afección se trata mediante la administración de FIX activo (FIXa) o FIX que no está activado. En algunos ejemplos, el tratamiento con la composición farmacéutica mejora o alivia los síntomas asociados con la enfermedad o afección. También se proporcionan métodos que contienen un paso para monitorizar al sujeto en busca de cambios en los síntomas asociados con la enfermedad o afección que se trata mediante la administración de FIX o un procoagulante.

La enfermedad o afección a tratar usando los métodos puede seleccionarse entre trastornos de coagulación de la sangre, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilias y trastornos hemorrágicos. En algunos ejemplos, la hemofilia es hemofilia B. Los métodos también pueden implicar la administración de uno o más factores de coagulación adicionales, como, por ejemplo, factores de coagulación purificados por plasma o recombinantes, procoagulantes, como vitamina K, derivados de vitamina K e inhibidores de proteína C, plasma, plaquetas, glóbulos rojos o corticosteroides.

También se proporcionan artículos de fabricación, que contienen material de envasado y una composición farmacéutica que contiene un polipéptido FIX modificado proporcionado contenido dentro del material de envasado. El polipéptido FIX modificado es efectivo para el tratamiento de una enfermedad tratable mediante la administración de FIX o un procoagulante, y el material de empaque incluye una etiqueta que indica que el polipéptido FIX modificado se usa para el tratamiento de una enfermedad tratable mediante la administración de FIX o un procoagulante

También se proporcionan kits que contienen cualquiera de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, un dispositivo para la administración de la composición y, opcionalmente, también instrucciones para la administración.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa la cascada de coagulación. La figura muestra la ruta intrínseca y la ruta extrínseca de coagulación para la producción independiente de FXa y la convergencia de las rutas a una ruta común para generar trombina y fibrina para la formación de un coágulo. Estas vías están interconectadas. La figura representa el orden de las moléculas involucradas en la cascada de activación en la que un zimógeno se convierte en una proteasa activada mediante la división de uno o más enlaces peptídicos. La proteasa activada sirve entonces como la proteasa activadora para la próxima molécula de zimógeno en la cascada, lo que finalmente resulta en la formación de coágulos.

La figura 2 representa el modelo de coagulación basado en células (véase, por ejemplo, Hoffman et al. (2001) Thromb Haemost 85: 958-965). La figura representa los eventos de coagulación como separados en tres fases, donde el inicio de la coagulación se efectúa mediante la activación de FX a FXa por el complejo TF/FVIIa en la célula portadora de TF,

lo que resulta en la generación de una pequeña cantidad de trombina después de la activación por FXa/FVa. La amplificación tiene lugar cuando la trombina se une a las plaquetas y las activa, e inicia la activación de cantidades suficientes de los factores de coagulación apropiados para formar los complejos FVIIIa/FIXa y FVa/FXa. La propagación de la coagulación ocurre en la superficie de un gran número de plaquetas activadas en el sitio de la lesión, lo que resulta en un estallido de generación de trombina que es lo suficientemente grande como para generar suficiente fibrina a partir del fibrinógeno para establecer un coágulo en el sitio de la lesión.

La Figura 3 es una alineación de diversos polipéptidos de Factor IX, que incluyen variantes de especies y polipéptidos de Factor IX modificados (SEQ ID NOS: 2-5, 14, 20, 172, 267, 247, 325, 346-347, 360, 365-366, 406). También se incluyen la SEQ ID NO: 6 de la patente de los Estados Unidos número 7,700,734 que contiene las mutaciones V86A/E277A/R338A y la SEQ ID NO: 2 de la patente de los Estados Unidos número 7,125,841. Un "*" significa que los residuos o nucleótidos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en la alineación, un ":" significa que se han observado sustituciones conservadas y un "." significa que se observan sustituciones semiconservadas. Como se describe en el presente documento, los residuos correspondientes a las posiciones en la SEQ ID NO: 3 pueden determinarse por alineación con la SEQ ID NO: 3. Los residuos correspondientes a Y155, R318, R338, T343, R403 y E410 se indican en texto en recuadro.

Descripción detallada

Esquema

A. Definiciones
B. Hemostasia y papel del factor IX en el mismo

1. Adhesión y agregación plaquetaria
2. Cascada de coagulación

a. Iniciación
b. Amplificación
c. Propagación

3. Regulación de la coagulación

C. Estructura y función del factor IX (FIX)

1. estructura FIX
2. Modificación postraduccional FIX
3. Activación FIX
4. función FIX
5. FIX como biofarmacéutico

D. Polipéptidos FIX modificados

1. Reemplazos ejemplares de aminoácidos

a. Glucosilación alterada

i. Ventajas de la glucosilación
ii. Ejemplos de polipéptidos FIX modificados con glucosilación alterada

(a). Introducción de sitios de glucosilación no nativos
(b). Eliminación de sitios de glucosilación nativos.

b. Mayor resistencia a AT-III y heparina

i. AT-III
ii. Heparina
iii. Ejemplos de polipéptidos FIX ejemplares con resistencia creciente a AT-III y heparina

c. Mutaciones para aumentar la actividad catalítica.
d. Mutaciones para disminuir la unión de LRP
e. Otras mutaciones para alterar la modificación postraduccional

2. Modificaciones de combinación

a. Modificaciones para aumentar la actividad.

b. Modificaciones que aumentan la afinidad por los fosfolípidos o reducen la unión al colágeno
c. Modificaciones adicionales para aumentar la resistencia a los inhibidores.
d. Modificaciones adicionales para alterar la glucosilación
e. Modificaciones para aumentar la resistencia a las proteasas.
f. Modificaciones para reducir la inmunogenicidad.
g. Modificaciones de combinación ejemplares

3. Conjugados y proteínas de fusión

E. Producción de polipéptidos FIX

1. Vectores y células
2. Sistemas de expresión

a. Expresión procariota
b. Levadura
c. Insectos y células de insectos
d. Células de mamífero
e. Plantas

2. Purificación
3. Proteínas de fusión
4. Modificación de polipéptidos
5. Secuencias de nucleótidos

F. Evaluación de las actividades modificadas del polipéptido FIX 1.

1. Ensayos in vitro

a. Glucosilación
b. Otras modificaciones postraduccionales
c. Actividad proteolítica
d. Actividad de coagulación
e. Unión y/o inhibición por otras proteínas y moléculas
e. Afinidad por fosfolípidos

2. Modelos animales no humanos
3. Ensayos clínicos

G. Formulación y administración

1. Formulaciones

a. Dosis
b. Formas de dosificación

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

H. Usos terapéuticos

Hemofilia

a. Hemofilia B
b. Hemofilia A

J. Terapias de combinación
K. Artículos de fabricación y kits
L. Ejemplos

A. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenecen las invenciones. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones de términos en el presente documento, prevalecerán las de esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección, se entiende que dichos identificadores

pueden cambiar y puede ir y venir información particular en Internet, pero se puede encontrar información equivalente buscando en Internet. La referencia a la misma evidencia la disponibilidad y difusión pública de dicha información.

Como se usa en este documento, la ruta de coagulación o la cascada de coagulación se refieren a la serie de eventos de activación que conducen a la formación de un coágulo de fibrina insoluble. En la ruta o cascada de coagulación, una proteína inactiva de una serina proteasa (también llamada zimógeno) se convierte en una proteasa activa mediante la división de uno o más enlaces peptídicos, que luego sirve como la proteasa activadora de la próxima molécula de zimógeno en la cascada. En la etapa proteolítica final de la cascada, el fibrinógeno se divide proteolíticamente mediante trombina a fibrina, que luego se reticula en el sitio de la lesión para formar un coágulo.

Como se usa en el presente documento, “hemostasia” se refiere a la detención de la hemorragia o flujo sanguíneo en un órgano o parte del cuerpo. El término hemostasia puede abarcar todo el proceso de coagulación de la sangre para evitar la pérdida de sangre después de la lesión de los vasos sanguíneos y la posterior disolución del coágulo de sangre después de la reparación del tejido.

Como se usa en el presente documento, “coagular” o “coagulación” se refiere a la formación de un coágulo de fibrina insoluble, o al proceso por el cual los factores de coagulación de la sangre interactúan en la cascada de coagulación, dando como resultado finalmente la formación de un coágulo fibrina insoluble.

Como se usa en el presente documento, una “proteasa” es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos covalentes. Estas designaciones incluyen formas de zimógeno y formas activadas de una, dos y múltiples cadenas de las mismas. Para mayor claridad, la referencia a proteasas se refiere a todas las formas. Las proteasas incluyen, por ejemplo, serina proteasas, cisteína proteasas, aspártico proteasas, treonina y metaloproteasas dependiendo de la actividad catalítica de su sitio activo y mecanismo de dividir de enlaces peptídicos de un sustrato diana.

Como se usa en el presente documento, las serina proteasas o serina endopeptidasas se refieren a una clase de peptidasas, que se caracterizan por la presencia de un residuo de serina en el sitio activo de la enzima. Las serina proteasas participan en una amplia gama de funciones en el cuerpo, incluida la coagulación de la sangre y la inflamación, además de funcionar como enzimas digestivas en procariotas y eucariotas. El mecanismo de división por serina proteasas se basa en el ataque nucleofílico de un enlace peptídico dirigido por una serina. Las moléculas de cisteína, treonina o agua asociadas con el aspartato o los metales también pueden desempeñar este papel. Las cadenas laterales alineadas de serina, histidina y aspartato forman una tríada catalítica común a la mayoría de las serina proteasas. El sitio activo de las serina proteasas tiene la forma de una hendidura donde se une el sustrato del polipéptido.

Como se usa en el presente documento, un polipéptido de “factor IX” o FIX se refiere a cualquier polipéptido de factor IX que incluye, pero no se limita a, un polipéptido producido recombinantemente, un polipéptido producido sintéticamente y un polipéptido de factor IX extraído o aislado de células o tejidos que incluyen, pero no limitado a, hígado y sangre. Los nombres alternativos que se usan indistintamente para el factor IX incluyen el factor 9, el factor Christmas, el componente de tromboplastina plasmática (PTC), el factor IX de coagulación y el factor IX sérico. Las abreviaturas para el factor IX incluyen FIX y F9. El Factor IX incluye polipéptidos relacionados de diferentes especies, incluidos, pero no limitados a, animales de origen humano y no humano. El factor IX humano (hFIX) incluye factor IX, isoformas de variantes alélicas (como la variante alélica que tiene una mutación T148A (SEQ ID NO: 20 o 325) o T412P), moléculas sintéticas de ácidos nucleicos, proteínas aisladas de células y tejidos humanos, y formas modificadas de los mismos. Los ejemplos de polipéptidos de factor IX humano maduro no modificado incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de factor IX nativo no modificado y de tipo silvestre (tal como el polipéptido que contiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3) y el polipéptido del factor IX precursor no modificado y de tipo silvestre que incluye un propéptido y/o un péptido señal (tal como el polipéptido precursor FIX que tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 2). Un experto en la materia reconocería que las posiciones referenciadas del polipéptido maduro del factor IX (SEQ ID NO: 3) difieren en 46 residuos de aminoácidos en comparación con el polipéptido precursor FIX SEQ ID NO: 2, que es el polipéptido del factor IX que contiene el péptido señal y las secuencias de propéptido. Por lo tanto, el primer residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 3 “corresponde” al cuadragésimo séptimo (47º) residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 2.

El término “factor IX” también abarca la forma activada del polipéptido del factor IX, llamado factor IXa (FIXa),que contiene la cadena ligera FIX (correspondiente a los aminoácidos 47-191 de SEQ ID NO: 2, y los aminoácidos 1-145 de SEQ ID NO: 3) y la cadena pesada FIX (correspondiente a los aminoácidos 227-461 de SEQ ID NO: 2, y los aminoácidos 181-415 de la SEQ ID NO: 3) unidos por un enlace disulfuro entre los residuos 132C y 289C (correspondiente al polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3). FIXa se produce a partir de un polipéptido FIX maduro (por ejemplo, el establecido en la SEQ ID NO: 3) mediante división proteolítica después de los residuos de aminoácidos R145 y R180. La división proteolítica puede llevarse a cabo, por ejemplo, por el factor XI activado (FXIa) o el complejo factor tisular/factor VII activado (TF/FVIIa). Los polipéptidos FIX proporcionados en el presente documento pueden modificarse adicionalmente, tal como mediante modificación química o modificación postraduccional. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, glucosilación, pegilación, albuminización, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica.

El factor IX incluye el factor IX de cualquier especie, incluidas las especies humanas y no humanas. Los polipéptidos FIX de origen no humano incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos murinos, caninos, felinos, leporinos, aviares, bovinos, ovinos, porcinos, equinos, “piscine”, “ranine” y otros polipéptidos del factor IX de primate. Los ejemplos de polipéptidos FIX de origen no humano incluyen, por ejemplo, chimpancé (Pan troglodytes, SEQ ID NO: 4), rhesus macaco (Macaca mulatta, SEQ ID NO: 5), ratón (Mus musculus, SEQ ID NO: 6), rata (Rattus norvegicus, SEQ ID NO: 7), conejillo de indias (Cavia porcellus, SEQ ID NO: 8), cerdo (Sus scrofa, SEQ ID NO: 9), perro (Canis familiaris, SEQ ID NO: 10), gato (Felis catus, SEQ ID NO: 11), conejo (Oryctolagus cuniculus, SEQ ID NO: 12), pollo (Gallus gallus, SEQ ID NO: 13), vaca (Bos Taurus, SEQ ID NO: 14), oveja (Ovis aries, SEQ ID NO: 15), rana (Xenopus tropicalis, SEQ ID NO: 16), pez cebra (Danio rerio, SEQ ID NO: 17), pez globo japonés (Takifugu rubripes, SEQ ID NO: 18).

La referencia a los polipéptidos FIX también incluye polipéptidos precursores y polipéptidos FIX maduros en formas de cadena simple o de dos cadenas, formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especies, variantes codificadas por variantes de empalme y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con el polipéptido precursor establecido en SEQ ID NO: 2 o la forma madura del mismo (SEQ ID NO: 3). Se incluyen polipéptidos FIX modificados, como los de SEQ ID NOS: 121, 122, 152, 153, 156, 161, 166, 169-173, 188, 219-226, 232-244, 249-258, 260, 264-267, 326-331, 333, 334, 336-341, 342, 345-350, 353-360, 366, 368, 369, 372-375, 378-381, 383-386, 393-395, 397, 398, 403-408, 410 y 411 y sus variantes. También se incluyen aquellos que retienen al menos una actividad de un FIX, como la unión de FVIIIa, la unión de factor X, la unión de fosfolípidos y/o la actividad coagulante de un polipéptido FIX. Al retener la actividad, la actividad puede ser alterada, tal como reducida o aumentada, en comparación con un FIX de tipo silvestre siempre que el nivel de actividad retenido sea suficiente para producir un efecto detectable. Los polipéptidos FIX incluyen, pero no están limitados a, isoformas específicas de tejido y variantes alélicas de los mismos, moléculas sintéticas preparadas por traducción de ácidos nucleicos, proteínas generadas por síntesis química, como síntesis que incluyen la ligadura de polipéptidos más cortos, mediante métodos recombinantes, proteínas aisladas de tejidos y células humanos y no humanos, polipéptidos FIX quiméricos y formas modificadas de los mismos. Los polipéptidos FIX también incluyen fragmentos o porciones de FIX que tienen una longitud suficiente o incluyen regiones apropiadas para retener al menos una actividad (tras la activación si es necesario) de un polipéptido maduro de longitud completa. Los polipéptidos FIX también incluyen aquellos que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y aquellos que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, albuminización, glucosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica.

Como se usa en el presente documento, los residuos correspondientes se refieren a residuos que se producen en los locus alineados. Los polipéptidos relacionados o variantes se alinean mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia. Tales métodos típicamente maximizan las coincidencias e incluyen métodos tales como el uso de alineaciones manuales y el uso de los numerosos programas de alineación disponibles (por ejemplo, BLASTP) y otros conocidos por los expertos en la materia. Al alinear 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, alineando las secuencias de polipéptidos del factor IX, un experto en la materia puede identificar los residuos correspondientes, utilizando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. Por ejemplo, la tirosina en la posición de aminoácido 1 (Y1) de SEQ ID NO: 3 (factor maduro IX) corresponde a la tirosina en la posición de aminoácido 47 (Y47) de SEQ ID NO: 2. En otros casos, se pueden identificar las regiones correspondientes. Por ejemplo, el dominio Gla corresponde a las posiciones de aminoácidos Y1 a V46 de SEQ ID NO: 3, y a las posiciones de aminoácidos Y47 a V92 de SEQ ID NO: 2. Un experto en la materia también puede emplear residuos de aminoácidos conservados como guías para encontrar los residuos de aminoácidos correspondientes entre secuencias humanas y no humanas. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos Q11 y P74 de SEQ ID NO: 3 (humanos) corresponden a R11 y Q74 de SEQ ID NO: 14 (bovino). Las posiciones correspondientes también pueden basarse en alineamientos estructurales, por ejemplo, mediante el uso de alineamientos simulados por ordenador de la estructura de la proteína. En otros casos, se pueden identificar las regiones correspondientes.

Como se usa en el presente documento, lo mismo, con referencia a un reemplazo de aminoácidos, se refiere al reemplazo idéntico en la posición de aminoácidos de referencia en la SEQ ID NO: 3 en una posición correspondiente en otro polipéptido de Factor IX. Por ejemplo, el mismo reemplazo con referencia al reemplazo de tirosina en el residuo de aminoácido R318 en SEQ ID NO: 3 es el reemplazo de tirosina en el residuo de aminoácido R319 en SEQ ID NO: 14 (ver, por ejemplo, Figura 3). Por ejemplo, el mismo reemplazo con referencia al reemplazo de asparagina en el residuo de aminoácido E410 en SEQ ID NO: 3 es el reemplazo de asparagina en el residuo de aminoácido S410 en SEQ ID NO: 366. Se entiende que la referencia al reemplazo del mismo aminoácido se refiere al reemplazo de residuos de aminoácidos que difieren en la posición correspondiente del residuo reemplazado.

Como se usa en el presente documento, una “proregión”, “propéptido” o “prosecuencia” se refiere a una región o un segmento que se divide para producir una proteína madura. Esto puede incluir segmentos que funcionan para suprimir la actividad proteolítica enmascarando la maquinaria catalítica y evitando así la formación del intermedio catalítico (es decir, ocluyendo estéricamente el sitio de unión al sustrato). Una proregión es una secuencia de aminoácidos posicionados en el extremo amino de un polipéptido biológicamente activo maduro y puede ser tan poco como unos pocos aminoácidos o puede ser una estructura multidominio.

Como se usa en el presente documento, “factor IX maduro” se refiere a un polipéptido FIX que carece de una secuencia señal y una secuencia de propéptido. Típicamente, una secuencia de señal se dirige a una proteína para secreción a través de la ruta del retículo endoplasmático (ER)-golgi y se divide después de la inserción en el ER durante la traducción. Una secuencia de propéptido típicamente funciona en la modificación postraduccional de la proteína y se divide antes de la secreción de la proteína desde la célula. Por lo tanto, un polipéptido FIX maduro es típicamente una proteína secretada. En un ejemplo, un polipéptido FIX humano maduro se expone en SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3 difiere de la del polipéptido precursor establecido en SEQ ID NO: 2 en que la SEQ ID NO: 3 carece de la secuencia de señal, que corresponde a los residuos de aminoácidos 1-28 de SEQ ID NO: 2, y también carece de la secuencia de propéptido, que corresponde a los residuos de aminoácidos 29-46 de SEQ ID NO: 2. La referencia a un polipéptido FIX maduro abarca la forma de zimógeno de cadena sencilla y la forma de dos cadenas. Por lo tanto, la referencia a un polipéptido FIX maduro también se refiere a la forma de dos cadenas que contiene la cadena pesada y la cadena ligera (sin el péptido de activación correspondiente a los aminoácidos 192-226 de la SEQ ID NO: 2) unidos por enlaces disulfuro.

Como se usa en el presente documento, “tipo silvestre” o “nativo” con referencia a FIX se refiere a un polipéptido FIX codificado por un gen FIX nativo o de ocurrencia natural, que incluye variantes alélicas, que está presente en un organismo, que incluye un ser humano y otros animales, en la naturaleza. La referencia al factor IX de tipo silvestre sin referencia a una especie pretende abarcar cualquier especie de un factor IX de tipo silvestre. Entre los polipéptidos FIX de tipo silvestre se incluyen el polipéptido precursor codificado, sus fragmentos y sus formas procesadas, como una forma madura que carece del péptido señal, así como cualquier forma procesada o modificada pre o postraduccionalmente de los mismos. También se incluyen entre los polipéptidos FIX nativos los que se modifican postraduccionalmente, que incluyen, pero no se limitan a, modificación por glucosilación, carboxilación e hidroxilación. Los polipéptidos FIX nativos también incluyen formas de cadena sencilla y de cadena doble. Por ejemplo, los humanos expresan FIX nativo. La secuencia de aminoácidos del ejemplo de FIX humano de tipo silvestre se establece en las SEQ ID NOS: 2 y 3 y sus variantes alélicas. Otros animales producen FIX nativo, incluidos, pero no están limitados a, chimpancés (Pan troglodytes, SEQ ID NO: 4), rhesus macaco (Macaca mulatta, SEQ ID NO: 5), ratón (Mus musculus, SEQ ID NO: 6), rata (Rattus norvegicus, SEQ ID NO: 7), conejillo de indias (Cavia porcellus, SEQ ID NO: 8), cerdo (Sus scrofa, SEQ ID NO: 9), perro (Canis familiaris, SEQ ID NO: 10), gato (Felis catus, SEQ ID NO: 11), conejo (Oryctolagus cuniculus, SEQ ID NO: 12), pollo (Gallus gallus, SEQ ID NO: 13), vaca (Bos Taurus, SEQ ID NO: 14), oveja (Ovis aries, SEQ ID NO: 15), rana (Xenopus tropicalis, SEQ ID NO: 16), pez cebra (Danio rerio, SEQ ID NO: 17), pez globo japonés (Takifugu rubripes, SEQ ID NO: 18).

Como se usa en el presente documento, las variantes de especies se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluidas diferentes especies de mamíferos, tales como ratón y humano.

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

Como se usa en este documento, una variante de empalme se refiere a una variante producida por procesamiento diferencial de una transcripción primaria de ADN genómico que da como resultado más de un tipo de ARNm.

Como se usa en el presente documento, un zimógeno se refiere a una proteasa que se activa mediante división proteolítica, que incluye división de maduración, tal como división de activación, y/o formación de complejos con otra(s) proteína(s) y/o cofactor(es). Un zimógeno es un precursor inactivo de una enzima proteolítica. Tales precursores son generalmente más grandes, aunque no necesariamente más grandes, que la forma activa. Con referencia a las serina proteasas, los zimógenos se convierten en enzimas activas mediante división específica, incluida la división catalítica y autocatalítica, o mediante la unión de un cofactor activador, que genera una enzima activa. Por ejemplo, generalmente, los zimógenos están presentes en una forma de cadena sencilla. Los zimógenos, en general, están inactivos y pueden convertirse en polipéptidos activos maduros mediante división catalítica o autocatalítica en uno o más sitios proteolíticos para generar un polipéptido multicadena, tal como un de dos cadenas. Un zimógeno, por lo tanto, es una proteína enzimáticamente inactiva que se convierte en una enzima proteolítica por la acción de un activador. La división puede realizarse por autoactivación. Una serie de proteínas de coagulación son zimógenos; están inactivos, pero se dividen y se activan al iniciarse el sistema de coagulación después del daño vascular. Con referencia a FIX, los polipéptidos FIX existen en el plasma sanguíneo como zimógenos hasta la división por proteasas, como, por ejemplo, FXI activado (FXIa) o FVIIa (en asociación con TF) para producir la forma de dos cadenas de FIX (FIXa).

Como se usa en el presente documento, una secuencia de activación se refiere a una secuencia de aminoácidos en un zimógeno que es el sitio requerido para la división de activación o división de maduración para formar una proteasa activa. La división de una secuencia de activación puede catalizarse de forma autocatalítica o activando socios.

Como se usa en este documento, la división de activación es un tipo de división de maduración, que induce un cambio de conformación que se requiere para el desarrollo de la actividad enzimática completa. Esta es una ruta de activación clásica, por ejemplo, para las serina proteasas en las que una división genera un nuevo N-terminal que interactúa con las regiones conservadas de la proteasa, como Asp 194 en quimotripsina, para inducir cambios conformacionales necesarios para la actividad. La activación puede resultar en la producción de formas de cadenas múltiples de las proteasas. En algunos casos, las formas de cadena sencilla de la proteasa pueden exhibir actividad proteolítica.

Como se usa en el presente documento, “Factor IX activado” o “FIXa” se refiere a cualquier forma de dos cadenas de un polipéptido FIXa. Una forma de dos cadenas típicamente resulta de la división proteolítica, pero puede producirse sintéticamente. El Factor IX activado, por lo tanto, incluye la forma de dos cadenas similar al zimógeno con baja actividad coagulante, una forma completamente activada que ocurre al unirse al FVIIIa y FX, y formas mutadas que existen en una forma de dos cadenas completamente activada o experimentan un cambio conformacional a una forma totalmente activada. Por ejemplo, una forma de cadena sencilla del polipéptido FIX (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 3) se divide proteolíticamente después de los residuos de aminoácidos R145 y R180 del polipéptido FIX maduro. Los productos de división, la cadena pesada FIX y la cadena ligera FIX, que se mantienen unidos mediante un enlace disulfuro (entre los residuos de aminoácidos 132C y 289C en el FIX de SEQ ID NO: 3), forman la enzima FIX activada de dos cadenas. La división proteolítica se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el factor XIa activado (FXIa) y el factor VIIa activado (FVIIa) en complejo con TF.

Como se usa en el presente documento, una “propiedad” de un polipéptido FIX se refiere a una propiedad física o estructural, tal estructura tridimensional, pI, vida media, conformación y otras características físicas similares.

Como se usa en el presente documento, una “actividad” de un polipéptido FIX se refiere a cualquier actividad exhibida por un polipéptido de factor IX. Dichas actividades pueden probarse in vitro y/o in vivo e incluyen, pero no se limitan a, actividad de coagulación o coagulante, actividad procoagulante, actividad proteolítica o catalítica tal como efectuar la activación del factor X (FX); antigenicidad (capacidad de unirse o competir con un polipéptido para unirse a un anticuerpo anti-FIX); capacidad de unirse al factor VIIIa o al factor X; y/o capacidad de unirse a fosfolípidos. La actividad puede evaluarse in vitro o in vivo utilizando ensayos reconocidos, por ejemplo, midiendo la coagulación in vitro o in vivo. Los resultados de tales ensayos indican que un polipéptido exhibe una actividad que puede correlacionarse con la actividad del polipéptido in vivo, en la que la actividad in vivo puede denominarse actividad biológica. Los expertos en la técnica conocen los ensayos para determinar la funcionalidad o actividad de las formas modificadas de FIX. Los ensayos ejemplares para evaluar la actividad de un polipéptido FIX incluyen el ensayo de tiempo de protromboplastina (PT) o el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) para evaluar la actividad coagulante, o ensayos cromogénicos usando sustratos sintéticos para evaluar la actividad catalítica o proteolítica.

Como se usa en el presente documento, “exhibe al menos una actividad” o “retiene al menos una actividad” se refiere a la actividad exhibida por un polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado de la misma forma y en las mismas condiciones. Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado en una forma de dos cadenas se compara con un polipéptido FIX no modificado en una forma de dos cadenas, en las mismas condiciones experimentales, donde la única diferencia entre los dos polipéptidos es la modificación en estudio. En otro ejemplo, un polipéptido FIX modificado en forma de cadena única se compara con un polipéptido FIX no modificado en forma de cadena única, en las mismas condiciones experimentales, donde la única diferencia entre los dos polipéptidos es la modificación en estudio. Típicamente, un polipéptido FIX modificado que retiene o exhibe al menos una actividad de un polipéptido FIX no modificado de la misma forma retiene una cantidad suficiente de la actividad de manera que, cuando se administra in vivo, el polipéptido FIX modificado es terapéuticamente efectivo como un agente terapéutico procoagulante. En general, para que un polipéptido FIX modificado retenga la eficacia terapéutica como procoagulante, 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 FIX no modificado de la misma forma que muestra eficacia terapéutica como procoagulante. La cantidad de actividad que se requiere para mantener la eficacia terapéutica como procoagulante puede determinarse empíricamente, si es necesario. Típicamente, la retención de 0.5% a 20%, 0.5% a 10%, 0.5% a 5% de una actividad es suficiente para retener la eficacia terapéutica como un procoagulante in vivo.

Se entiende que la actividad exhibida o retenida por un polipéptido FIX modificado puede ser cualquier actividad, que incluye, pero no se limita a, coagulación o actividad coagulante, actividad procoagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como efectuar la activación del factor X (FX); antigenicidad (capacidad de unirse o competir con un polipéptido para unirse a un anticuerpo anti-FIX); capacidad de unirse al factor VIIIa o al factor X; y/o capacidad de unirse a fosfolípidos. En algunos casos, un polipéptido FIX modificado puede retener una actividad que aumenta en comparación con un polipéptido FIX no modificado. En algunos casos, un polipéptido FIX modificado puede retener una actividad que disminuye en comparación con un polipéptido FIX no modificado. La actividad de un polipéptido FIX modificado puede ser cualquier nivel de porcentaje de actividad del polipéptido no modificado, donde ambos polipéptidos están en la misma forma, incluyendo pero no limitado a, 1% de la actividad, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más actividad en comparación con el polipéptido que no contiene la modificación en cuestión. Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado puede exhibir una actividad aumentada o disminuida en comparación con el polipéptido FIX no modificado en la misma forma. Por ejemplo, puede retener al menos aproximadamente 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 el 99% de la actividad del polipéptido FIX no modificado. En otras realizaciones, el cambio en la 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 que FIX no modificado. El nivel particular a retener es una función del

uso previsto del polipéptido y puede determinarse empíricamente. La actividad puede medirse, por ejemplo, usando ensayos in vitro o in vivo tales como los descritos aquí.

Como se usa en el presente documento, “actividad de coagulación” o “actividad coagulante” o “actividad procoagulante” se refiere a la capacidad de un polipéptido para efectuar la coagulación. Los expertos en la técnica conocen los ensayos para evaluar la actividad coagulante e incluyen el ensayo del tiempo de protrombina (PT) o el ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT).

Como se usa en el presente documento, “actividad catalítica” o “actividad proteolítica” con referencia a FIX se refiere a la capacidad de una proteína FIX para catalizar la división proteolítica de un sustrato, y se usan indistintamente. Los ensayos para evaluar tales actividades son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la actividad proteolítica de FIX se puede medir utilizando sustratos cromogénicos como Mes-D-CHD-Gly-Arg-AMC, donde la división del sustrato se controla por absorbancia y la velocidad de hidrólisis del sustrato se determina por regresión lineal.

Como se usa en este documento, el 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 codificadores, que es estructural y/o funcionalmente distinto de otras porciones de la molécula y es identificable. Por ejemplo, los dominios incluyen aquellas porciones de una cadena de polipéptidos que pueden formar una estructura plegada independientemente dentro de una proteína compuesta por uno o más motivos estructurales y/o que se reconoce en virtud de una actividad funcional, como la actividad proteolítica. Una proteína puede tener uno, o más de uno, dominios distintos. Por ejemplo, un dominio puede identificarse, definirse o distinguirse por homología de la secuencia en el mismo con miembros de la familia relacionados, tal como homología con motivos que definen un dominio de proteasa o un dominio gla. En otro ejemplo, un dominio puede distinguirse por su función, tal como por la actividad proteolítica, o la capacidad de interactuar con una biomolécula, tal como la unión al ADN, la unión al ligando y la dimerización. Un dominio independientemente puede exhibir una función o actividad biológica de manera que el dominio independientemente o fusionado a otra molécula pueda realizar una actividad, tal como, por ejemplo, actividad proteolítica o unión a ligando. Un dominio puede ser una secuencia lineal de aminoácidos o una secuencia no lineal de aminoácidos. Muchos polipéptidos contienen una pluralidad de dominios. Dichos dominios son conocidos y pueden ser identificados por los expertos en la materia. Para ejemplificar aquí, se proporcionan definiciones, pero se entiende que corresponde al experto en la técnica reconocer dominios particulares por nombre. Si es necesario, se puede emplear el software apropiado para identificar dominios.

Como se usa en este documento, un dominio de proteasa es la porción catalíticamente activa de una proteasa. La referencia a un dominio de proteasa de una proteasa incluye las formas sencilla, doble y multicadena de cualquiera de estas proteínas. Un dominio de proteasa de una proteína contiene todas las propiedades requeridas de esa proteína requeridas para su actividad proteolítica, como por ejemplo, el centro catalítico. En referencia a FIX, el dominio de proteasa comparte homología y característica estructural con los dominios de proteasa de la familia quimotripsina/tripsina, incluida la tríada catalítica. Por ejemplo, en el polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3, el dominio de proteasa corresponde a las posiciones de aminoácidos 181 a 412.

Como se usa en el presente documento, un dominio de gamma-carboxiglutamato (Gla) se refiere a la porción de una proteína, por ejemplo, una proteína dependiente de vitamina K, que contiene modificaciones postraduccionales de residuos de glutamato, generalmente la mayoría, pero no todos los residuos de glutamato, por carboxilación dependiente de vitamina K para formar Gla. El dominio Gla es responsable de la unión de iones de calcio de alta afinidad y de la unión a fosfolípidos cargados negativamente. Típicamente, el dominio Gla comienza en el extremo N-terminal de la forma madura de proteínas dependientes de vitamina K y termina con un residuo aromático conservado. En un polipéptido FIX maduro, el dominio Gla corresponde a las posiciones de aminoácidos 1 a 46 del polipéptido ejemplar establecido en SEQ ID NO: 3. Los dominios Gla son bien conocidos y su locus se pueden identificar en polipéptidos particulares. Los dominios Gla de las diversas proteínas dependientes de la vitamina K comparten secuencia, homología estructural y funcional, incluida la agrupación de residuos hidrófobos N-terminales en un parche hidrófobo que media la interacción con fosfolípidos cargados negativamente en la membrana de la superficie celular. Otros ejemplos de polipéptidos que contienen Gla incluyen, pero no se limitan a, FVII, FX, protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína Gla de matriz, proteína 6 específica de detención del crecimiento (Gas6) y proteína Z.

Como se usa en este documento, un dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (EGF-1 o EGF-2) se refiere a la porción de una proteína que comparte homología de secuencia con una porción específica de 30 a 40 aminoácidos de la secuencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El dominio EGF incluye seis residuos de cisteína que se ha demostrado (en EGF) que están involucrados en enlaces disulfuro. La estructura principal de un dominio EGF es una hoja beta de dos cadenas seguida de un bucle a un C-terminal de hoja corta de dos cadenas. FIX contiene dos dominios EGF: EGF-1 y EGF-2. Estos dominios corresponden a las posiciones de aminoácidos 47-83 y 84-125, respectivamente, del polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3.

Como se usa en el presente documento, “polipéptido no modificado” o “FIX no modificado” y las variaciones gramaticales del mismo se refieren a un polipéptido de partida que se selecciona para modificación como se describe en el presente documento. El polipéptido de partida puede ser una forma de ocurrencia natural, tipo silvestre, de un polipéptido. Además, el polipéptido de partida se puede alterar o mutar, de modo que difiere de una isoforma de tipo

silvestre nativa, pero se hace referencia aquí como un polipéptido de partida no modificado en relación con los polipéptidos modificados posteriormente producidos en la presente. Por lo tanto, las proteínas existentes conocidas en la técnica que se han modificado para tener un aumento o disminución deseados en una actividad o propiedad particular en comparación con una proteína de referencia no modificada pueden seleccionarse y usarse como el polipéptido de partida no modificado. Por ejemplo, una proteína que ha sido modificada de su forma nativa por uno o más cambios de aminoácidos individuales y posee un aumento o una disminución en una propiedad deseada, como un cambio en un residuo o residuos de aminoácidos para alterar la glucosilación, puede ser una proteína diana, denominada en el presente documento como no modificada, para una modificación adicional de la misma propiedad o de una diferente. Los polipéptidos FIX modificados ejemplares conocidos en la técnica incluyen cualquier polipéptido FIX descrito en, por ejemplo, Schuettrumpf et al., (2005) Blood105(6): 2316-23; Melton et al., (2001) Blood Coagul. Fibrinólisis 12(4): 237-43; Cheung et al., (1992) J. Biol. Chem 267: 20529-20531; Cheung et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 93: 11068-11073; Hopfner et al., (1997) EMBO J. 16: 6626-6635; Sichler et al., (2003) J. Biol. Chem 278: 4121-4126; Begbie et al., (2005) Thromb. Haemost 94(6): 1138-47; Chang, J. et al., (1998) J. Biol. Chem 273(20): 12089-94; Yang, L. et al., (2002) J. Biol. Chem 277(52): 50756-60; Yang, L. et al., (2003) J. Biol. Chem 278(27): 25032-8; Patentes de los Estados Unidos Nos. 5969040, 5621039, 6423826, 7125841, 6017882, 6531298; Publicaciones de patentes de EE. UU. Nos. 20030211094, 20070254840, 20080188414, 2008000422, 20080050772, 20080146494, 20080050772, 20080187955, 20040254106, 20050147618, 20080280818, 20080102115, 20080167219 y 20080214461; y las publicaciones de patentes internacionales Nos. WO2007112005, WO2007135182, WO2008082613, WO2008119815, WO2008119815, WO2007149406, WO2007112005 y WO2004101740.

Como se usa en este documento, “polipéptidos de factor IX modificado” y “factor IX modificado” se refieren a un polipéptido FIX que tiene una o más diferencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido de factor IX no modificado. La una o más diferencias de aminoácidos pueden ser mutaciones de aminoácidos tales como uno o más reemplazos de aminoácidos (sustituciones), inserciones o deleciones, o pueden ser inserciones o deleciones de dominios completos, y cualquier combinación de los mismos. Típicamente, un polipéptido FIX modificado tiene una o más modificaciones en la secuencia primaria en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado proporcionado en este documento puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 diferencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Se contempla cualquier modificación siempre que el polipéptido resultante muestre al menos una actividad FIX asociada con un polipéptido FIX nativo, tal como, por ejemplo, actividad catalítica, actividad proteolítica, la capacidad de unirse a FVIIIa o la capacidad de unirse a fosfolípidos.

Como se usa en el presente documento, “antitrombina III” o “AT-III” es un inhibidor de la serina proteasa (serpina). AT-III se sintetiza como una proteína precursora que contiene 464 residuos de aminoácidos (SEQ ID NO: 21) que se divide durante la secreción para liberar una antitrombina madura de 432 aminoácidos (SEQ ID NO: 22).

Como se usa en el presente documento, “heparina” se refiere a un grupo heterogéneo de glicosaminoglucanos altamente sulfatados de cadena lineal que tienen propiedades anticoagulantes. La heparina puede unirse a AT-III para formar el complejo AT-III/heparina.

Como se usa en este documento, “resistencia aumentada a AT-III y/o heparina” se refiere a cualquier cantidad de sensibilidad disminuida de un polipéptido, tal como un polipéptido FIX modificado, a los efectos inhibitorios de AT-III solo, heparina sola y/o el complejo AT-III/heparina en comparación con un polipéptido de referencia, como un polipéptido FIX no modificado. El aumento de la resistencia a AT-III, heparina y/o un complejo AT-III/heparina se puede ensayar evaluando la unión de un polipéptido FIX modificado a AT-III, heparina y/o un complejo AT-III. El aumento de la resistencia también se puede ensayar midiendo la inhibición de la actividad catalítica o coagulante de un polipéptido FIX en presencia de AT-III, heparina o un complejo AT-III/heparina. Los ensayos para determinar la unión de un polipéptido a un inhibidor o la inhibición de la actividad enzimática de un polipéptido por un inhibidor son conocidos en la técnica. Para inhibidores covalentes, tales como, por ejemplo, AT-III o un complejo AT-III/heparina, se puede medir una constante de velocidad de segundo orden para la inhibición. Para inhibidores no covalentes, tales como, por ejemplo, heparina, se puede medir un k_i. Además, la resonancia plasmática superficial, como en un instrumento biosensor BIAcore, también se puede usar para medir la unión de los polipéptidos FIX a AT-III, heparina y/o un complejo AT-III/heparina usando una o más condiciones definidas. Sin embargo, para los inhibidores covalentes como AT-III o un complejo AT-III/heparina, solo se puede medir un índice de actividad utilizando BIAcore; para inhibidores no covalentes como la heparina, se pueden medir tanto la tasa de activación como la de desactivación. Los ensayos para determinar el efecto inhibidor de, por ejemplo, AT-III/heparina sobre la actividad coagulante FIX también son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede medir la capacidad de un polipéptido FIX modificado para dividir su sustrato FX en presencia o ausencia de AT-III/heparina, y se determina el grado en que AT-III/heparina inhibe la reacción. Esto se puede comparar con la capacidad de un polipéptido FIX no modificado para dividir su sustrato FX en presencia o ausencia de AT-III. Alternativamente, la constante de velocidad de segundo orden para la inhibición de un polipéptido FIX se puede medir y comparar con la constante de velocidad de segundo orden para la inhibición de un polipéptido FIX no modificado. Cuando se comparan las constantes de velocidad de segundo orden para la inhibición, una mayor resistencia a la inhibición significa una constante de velocidad de inhibición de segundo orden disminuido. Un polipéptido modificado que exhibe mayor resistencia a AT-III y/o heparina exhibe, por ejemplo, un aumento de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más de resistencia a los efectos de AT-III, heparina y/o un complejo AT-III/heparina, respectivamente, en comparación con un polipéptido no modificado.

Como se usa en el presente documento, 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, se requiere la unión a un cofactor para una actividad proteolítica óptima. Por ejemplo, FVIIIa es un cofactor de FIXa. La unión de FVIIIa a FIXa induce cambios conformacionales que resultan en una mayor actividad proteolítica de FIXa para su sustrato, FX.

Como se usa en el presente documento, un sitio de glucosilación se refiere a una posición amino en un polipéptido al que se puede unir una fracción de carbohidrato. Típicamente, una proteína glucosilada contiene uno o más residuos de aminoácidos, como asparagina o serina, para la unión de las fracciones de carbohidrato.

Como se usa en el presente documento, un sitio de glucosilación nativo se refiere a la posición de un aminoácido al que se une una fracción de carbohidrato en un polipéptido de tipo silvestre. Hay seis sitios de glucosilación nativos en FIX; dos sitios de N-glucosilación en N157 y N167, y seis sitios de O-glucosilación en S53, S61, T159, T169, T172 y T179, correspondientes a las posiciones de aminoácidos en el polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3.

Como se usa en este documento, un sitio de glucosilación no nativo se refiere a la posición de un aminoácido al que se une una fracción de carbohidrato en un polipéptido modificado que no está presente en un polipéptido de tipo silvestre. Los sitios de glucosilación no nativos pueden introducirse en un polipéptido FIX mediante reemplazo de aminoácidos. Los sitios de O-glucosilación pueden crearse, por ejemplo, mediante el reemplazo de aminoácidos de un residuo nativo con una serina o treonina. Se pueden crear sitios de N-glucosilación, por ejemplo, estableciendo el motivo Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, donde Xaa no es prolina. La creación de esta secuencia de consenso mediante modificación de aminoácidos puede implicar, por ejemplo, un reemplazo de un solo aminoácido de un residuo de aminoácido nativo con una asparagina, un reemplazo de un solo aminoácido de un residuo de aminoácido nativo con una serina, treonina o cisteína, o un reemplazo doble de aminoácidos que involucra un primer reemplazo de aminoácidos de un residuo nativo con una asparagina y un segundo reemplazo de aminoácidos del residuo nativo con una serina, treonina o cisteína.

Como se usa en este documento, “mayores niveles de glucosilación” y cualquier variación gramatical de los mismos, se refiere a una mayor cantidad de carbohidratos unidos a un polipéptido en comparación con un polipéptido o proteína de referencia. El carbohidrato puede estar unido a N, unido a O, unido a C o unido por cualquier otro enlace. El nivel de glucosilación se puede aumentar al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 40%, 500% o más en comparación con el nivel de glucosilación de un polipéptido no modificado. Los ensayos para determinar el nivel de glucosilación (es decir, la cantidad de carbohidratos) de un polipéptido son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el contenido de carbohidratos o el nivel de glucosilación se pueden evaluar mediante cromatografía de intercambio aniónico de pH alto, electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE), digestiones secuenciales de exoglucosidasa, espectrometría de masas, RMN, electroforesis en gel o cualquier otro método descrito en este documento o conocido en el arte.

Como se usa en el presente documento, “actividad biológica” se refiere a las actividades in vivo de un compuesto o respuestas fisiológicas que resultan de 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 tales compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden observarse en sistemas in vitro diseñados para probar o usar tales actividades. Por lo tanto, para los fines de la presente memoria, una actividad biológica de un polipéptido FIX abarca la actividad coagulante.

Como se usa en el presente documento, una propiedad farmacocinética se refiere a una propiedad relacionada con la acción de un fármaco o agente, tal como un polipéptido FIX, en el cuerpo y, en particular, la velocidad a la que los fármacos se absorben, distribuyen, metabolizan y eliminan por el cuerpo. La farmacocinética se puede evaluar mediante diversos parámetros. Estos incluyen, pero no están limitados a, depuración, volumen de distribución, recuperación in vivo, exposición total modificada de polipéptidos FIX in vivo, vida media en suero y tiempo medio de resonancia (MRT). Las propiedades farmacocinéticas del polipéptido se pueden evaluar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, administrar el polipéptido a un modelo humano o animal y evaluar la cantidad de FIX en el cuerpo en diversos puntos de tiempo. Los diversos parámetros, como la depuración, el volumen de distribución, la recuperación in vivo, la exposición total modificada de polipéptidos FIX in vivo, la vida media en suero y el tiempo de resonancia medio (MRT), se evalúan utilizando cálculos bien conocidos en la técnica y descritos en este documento.

Como se usa en el presente documento, “propiedades farmacocinéticas mejoradas” se refiere a un cambio deseable en una propiedad farmacocinética de un polipéptido, tal como un polipéptido FIX modificado, en comparación con, por ejemplo, un polipéptido FIX no modificado. El cambio puede ser un aumento o una disminución.

Como se usa en este documento, la depuración se refiere a la eliminación de un agente, tal como un polipéptido, del cuerpo de un sujeto después de la administración. La depuración se puede evaluar usando métodos bien conocidos en la técnica, como los descritos en el Ejemplo 6. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos en los que se administra un polipéptido FIX a ratones, y se puede evaluar la depuración del polipéptido del cuerpo midiendo la cantidad de FIX en el plasma en diversos puntos de tiempo y calculando la depuración como Dosis/$AUC_{0\text{-}inf}$. La depuración mejorado de un

polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado se refiere a una disminución en la depuración de un polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado. La depuración de un polipéptido FIX modificado se puede disminuir al menos o aproximadamente 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% o 99% en comparación con un polipéptido FIX no modificado.

Como se usa en este documento, el tiempo medio de resonancia (MRT) se refiere a la cantidad de tiempo que un polipéptido FIX reside en el cuerpo después de la administración. El MRT se puede evaluar usando métodos bien conocidos en la técnica, como los descritos en el Ejemplo 6. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos en los que se administra un polipéptido FIX a ratones, y se puede evaluar el MRT del polipéptido evaluado al medir la cantidad de FIX en el plasma en diversos puntos de tiempo y calculando el MRT como $AUMC_{0\text{-último}}/AUC_{0\text{-último}}$, donde $AUC_{0\text{-último}}$ es el área total bajo la curva y $AUMC_{0\text{-último}}$ es el área total bajo la primera curva de momento versus tiempo. La MRT mejorada de un polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado se refiere a un aumento en la MRT de un polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado. El MRT de un polipéptido FIX modificado se puede aumentar al menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más en comparación con un polipéptido FIX no modificado.

Como se usa en el presente documento, la recuperación in vivo se refiere al porcentaje de polipéptido FIX detectable en la circulación después de un período de tiempo después de la administración en relación con la cantidad total de polipéptido FIX administrado. La recuperación in vivo se puede evaluar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, como los descritos en el Ejemplo 6. Por ejemplo, ensayos en el que se puede administrar un polipéptido FIX a ratones, y la recuperación in vivo del polipéptido se evalúa midiendo la cantidad de FIX en el plasma a $C_{máx}$ y comparándola con la cantidad de FIX administrada. La recuperación in vivo mejorada de un polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado se refiere a un aumento en la recuperación in vivo de un polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado. La recuperación in vivo de un polipéptido FIX modificado se puede aumentar al menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más en comparación con un polipéptido FIX no modificado.

Como se usa en este documento, la semivida plasmática ($t_{1/2}$) se refiere a la semivida de eliminación de un polipéptido FIX, o el momento en que la concentración plasmática del polipéptido FIX ha alcanzado la mitad de su concentración inicial o máxima después de administración. La referencia a la vida media plasmática incluye la vida media plasmática durante la fase α, β y/o γ. La vida media en plasma se puede evaluar usando métodos bien conocidos en la técnica, como los descritos en el Ejemplo 6. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos en los que se administra un polipéptido FIX a ratones, y se puede evaluar la vida media en plasma del polipéptido midiendo la cantidad de FIX en el plasma en diversos puntos de tiempo. El $T_{1/2\beta}$, por ejemplo, se calcula como -ln2 dividido por la pendiente negativa durante la fase terminal de la gráfica logarítmica lineal de la curva de concentración FIX de plasma en función del tiempo. La vida media plasmática mejorada de un polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado se refiere a un aumento en la vida media plasmática de un polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado. La vida media plasmática de un polipéptido FIX modificado se puede aumentar al menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más en comparación con un polipéptido FIX no modificado.

Como se usa en este documento, la exposición in vivo se refiere a la cantidad de polipéptido FIX en la circulación después de la administración en relación con el área plasmática bajo la curva de concentración-tiempo, o AUC, del polipéptido FIX administrado. La exposición in vivo se puede evaluar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, como los descritos en el Ejemplo 6. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos en los que se administra un polipéptido FIX a ratones, y se puede evaluar la recuperación in vivo del polipéptido evaluado midiendo la cantidad de FIX en el plasma en diversos puntos de tiempo (es decir, AUC) y comparándolo con la cantidad de FIX administrada. La exposición mejorada in vivo de un polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado se refiere a un aumento en la exposición in vivo de un polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado. La exposición in vivo de un polipéptido FIX modificado se puede aumentar al menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más en comparación con un polipéptido FIX no modificado.

Como se usa en este documento, el volumen de distribución se refiere a la distribución de un polipéptido FIX entre plasma y la fracción del cuerpo después de la administración. Éste se define como el volumen en el que la cantidad de polipéptido necesitaría distribuirse uniformemente para producir la concentración observada de polipéptido en el plasma. El volumen de distribución se puede evaluar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, como los descritos en el Ejemplo 6. Por ejemplo, V_{ss}, que es el volumen de distribución en estado estacionario (calculado como MRT*C1) y V_z, que es el volumen de la distribución basada en la constante de eliminación terminal (β) (calculada como $Cl/(ln2/T_{1/2\beta})$, puede evaluarse en ensayos en los que se administra un polipéptido FIX a ratones, y la concentración de FIX en el plasma se determina a diversos puntos de tiempo. El volumen mejorado de distribución de un polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado, dependiendo del mecanismo de depuración de la

proteína y el perfil de seguridad, puede referirse a un aumento o una disminución en el volumen de distribución de un polipéptido FIX modificado. Por ejemplo, en los casos en que el polipéptido se distribuye entre múltiples compartimientos, una disminución del volumen de distribución de un polipéptido FIX modificado podría dar lugar a un aumento significativo de la exposición y la actividad del fármaco en el compartimento de interés (p. ej., el compartimento vascular versus un compartimento extravascular) en comparación con un polipéptido FIX no modificado. En otros casos, por ejemplo, cuando la seguridad de los medicamentos está limitada por la $C_{máx}$, la redistribución en otros compartimentos (por ejemplo, la unión a la superficie de las células endoteliales) puede dar como resultado una vida media terminal más larga y/o una duración de la acción dentro del compartimento de interés y un perfil de seguridad superior en comparación con el polipéptido FIX no modificado. El volumen de distribución de un polipéptido FIX modificado puede disminuirse al menos o aproximadamente 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% o 99% en comparación con un polipéptido FIX no modificado. En otros ejemplos, el volumen de distribución del polipéptido FIX modificado aumenta al menos o aproximadamente 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 del volumen de distribución de un polipéptido FIX no modificado.

Como se usa en el presente documento, 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, relación, porcentaje, valor visual u otro indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la detección de la división de un sustrato por un polipéptido puede ser por medición directa del producto, o puede medirse indirectamente determinando la actividad resultante del sustrato dividido.

Como se usa en el presente documento, “numeración de quimotripsina” se refiere a la numeración de aminoácidos de un polipéptido de quimotripsina bovina madura de SEQ ID NO: 19. La alineación de un dominio de proteasa de otra proteasa, como por ejemplo el dominio de proteasa del factor IX, se puede hacer con quimotripsina. En tal caso, los aminoácidos del factor IX que corresponden a los aminoácidos de quimotripsina se les da la numeración de los aminoácidos de quimotripsina. Las posiciones correspondientes pueden determinarse mediante dicha alineación por un experto en la técnica utilizando alineaciones manuales o utilizando los numerosos programas de alineación disponibles (por ejemplo, BLASTP). Las posiciones correspondientes también pueden basarse en alineamientos estructurales, por ejemplo, mediante el uso de alineamientos simulados por ordenador de la estructura de la proteína. La cita de que los aminoácidos de un polipéptido corresponden a aminoácidos en una secuencia divulgada se refiere a aminoácidos identificados al alinear el polipéptido con la secuencia divulgada para maximizar la identidad u homología (donde los aminoácidos conservados están alineados) usando un algoritmo de alineación estándar, como el algoritmo GAP. Los números de quimotripsina correspondientes de las posiciones de aminoácidos 181 a 415 del polipéptido FIX establecido en SEQ ID NO: 3 se proporcionan en la Tabla 1. Las posiciones de aminoácidos en relación con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 3 están en letra normal, los residuos de aminoácidos en esas posiciones están en negrita, y los números de quimotripsina correspondientes están en cursiva. Por ejemplo, tras la alineación del factor IX maduro (SEQ ID NO: 3) con quimotripsina madura (SEQ ID NO: 19), la valina (V) en la posición de aminoácido 181 en el factor IX recibe la numeración de quimotripsina de V16. Los aminoácidos posteriores se numeran en consecuencia. En un ejemplo, un ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido 213 del factor IX maduro (SEQ ID NO: 3) corresponde a la posición de aminoácido E49 en base a la numeración de quimotripsina. Cuando existe un residuo en una proteasa, pero no está presente en la quimotripsina, el residuo de aminoácido recibe una notación de letras. Por ejemplo, A95a y A95b por numeración de quimotripsina corresponden a A261 y A262, respectivamente, por numeración relativa a la secuencia del factor IX maduro (SEQ ID NO: 3).

Tabla 1. Numeración de quimotripsina del factor IX

181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
V	**V**	**G**	**G**	**E**	**D**	**A**	**K**	**P**	**G**	**Q**	**F**	**P**	**W**	**Q**
16	*17*	*18*	*19*	*20*	*21*	*22*	*23*	*24*	*25*	*26*	*27*	*28*	*29*	*30*
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
V	**V**	**L**	**N**	**G**	**K**	**V**	**D**	**A**	**F**	**C**	**G**	**G**	**S**	**I**
31	*32*	*33*	*34*	*35*	*37*	*38*	*39*	*40*	*41*	*42*	*43*	*44*	*45*	*46*
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
V	**N**	**E**	**K**	**W**	**I**	**V**	**T**	**A**	**A**	**H**	**C**	**V**	**E**	**T**
47	*48*	*49*	*50*	*51*	*52*	*53*	*54*	*55*	*56*	*57*	*58*	*59*	*60*	*60A*
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240

G	**V**	**K**	**I**	**T**	**V**	**V**	**A**	**G**	**E**	**H**	**N**	**I**	**E**	**E**
61	*62*	*63*	*64*	*65*	*66*	*67*	*68*	*69*	*70*	*71*	*72*	*73*	*74*	*75*
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
T	**E**	**H**	**T**	**E**	**Q**	**K**	**R**	**N**	**V**	**I**	**R**	**I**	**I**	**P**
76	*77*	*78*	*79*	*80*	*81*	*82*	*83*	*84*	*85*	*86*	*87*	*88*	*89*	*90*
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
H	**H**	**N**	**Y**	**N**	**A**	**A**	**I**	**N**	**K**	**Y**	**N**	**H**	**D**	**I**
91	*92*	*93*	*94*	*95*	*95A*	*95B*	*96*	*97*	*98*	*99*	*100*	*101*	*102*	*103*
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285
A	**L**	**L**	**E**	**L**	**D**	**E**	**P**	**L**	**V**	**L**	**N**	**S**	**Y**	**V**
104	*105*	*106*	*107*	*108*	*109*	*110*	*111*	*112*	*113*	*114*	*115*	*116*	*117*	*118*
286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
T	**P**	**I**	**C**	**I**	**A**	**D**	**K**	**E**	**Y**	**T**	**N**	**I**	**F**	**L**
119	*120*	*121*	*122*	*123*	*124*	*125*	*126*	*127*	*128*	*129*	*129A*	*129B*	*130*	*131*
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
K	**F**	**G**	**S**	**G**	**Y**	**V**	**S**	**G**	**W**	**G**	**R**	**V**	**F**	**H**
132	*133*	*134*	*135*	*136*	*137*	*138*	*139*	*140*	*141*	*142*	*143*	*144*	*145*	*147*
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
K	**G**	**R**	**S**	**A**	**L**	**V**	**L**	**Q**	**Y**	**L**	**R**	**V**	**P**	**L**
148	*149*	*150*	*151*	*152*	*153*	*154*	*155*	*156*	*157*	*158*	*159*	*160*	*161*	*162*
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
V	**D**	**R**	**A**	**T**	**C**	**L**	**R**	**S**	**T**	**K**	**F**	**T**	**I**	**Y**
163	*164*	*165*	*166*	*167*	*168*	*169*	*170*	*171*	*172*	*173*	*174*	*175*	*176*	*177*
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
N	**N**	**M**	**F**	**C**	**A**	**G**	**F**	**H**	**E**	**G**	**G**	**R**	**D**	**S**
178	*179*	*180*	*181*	*182*	*183*	*184*	*184A*	*185*	*186*	*187*	*188*	*188A*	*189*	*190*
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
C	**Q**	**G**	**D**	**S**	**G**	**G**	**P**	**H**	**V**	**T**	**E**	**V**	**E**	**G**
191	*192*	*193*	*194*	*195*	*196*	*197*	*198*	*199*	*200*	*201*	*202*	*203*	*204*	*205*
376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
T	**S**	**F**	**L**	**T**	**G**	**I**	**I**	**S**	**W**	**G**	**E**	**E**	**C**	**A**
206	*207*	*208*	*209*	*210*	*211*	212	*213*	*214*	*215*	*216*	*217*	*219*	*220*	*221*
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
M	**K**	**G**	**K**	**Y**	**G**	**I**	**Y**	**T**	**K**	**V**	**S**	**R**	**Y**	**V**
221A	*222*	*223*	*224*	*225*	*226*	*227*	*228*	*229*	*230*	*231*	*232*	*233*	*234*	*235*
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415					
N	**W**	**I**	**K**	**E**	**K**	**T**	**K**	**L**	**T**					

236	*237*	*328*	*239*	*240*	*241*	*242*	*243*	*244*	*245*					

Como se usa en el presente documento, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluidos los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y sus mezclas. Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están opcionalmente marcados, como con un marcador detectable, como un marcador fluorescente o radiomarcado, se contemplan moléculas de cadena sencilla. Dichas moléculas son típicamente de una longitud tal que su objetivo es estadísticamente único o de bajo número de copias (típicamente menos de 5, generalmente menos de 3) para sondear o cebar una biblioteca. Generalmente una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria o idéntica a un gen de interés. Las sondas y los cebadores pueden tener una longitud de 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de longitud.

Como se usa en el presente documento, un péptido se refiere a un polipéptido que tiene de 2 a 40 aminoácidos de longitud.

Como se usa en el presente documento, se identifican los aminoácidos que se producen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento de acuerdo con sus abreviaturas conocidas de tres letras o una letra (Tabla 2). Los nucleótidos que se producen en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones estándar de una letra utilizadas habitualmente en la técnica.

Como se usa en el presente documento, un “aminoácido” es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para los fines del presente documento, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en los que el carbono α tiene una cadena lateral).

De acuerdo con la nomenclatura de polipéptidos estándar descrita en J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968), y el 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822 adoptado, las abreviaturas para los residuos de aminoácidos se muestran en la Tabla 2A:

Tabla 2A – Tabla de Correspondencia

SÍMBOLO		
1-Letra	**3-Letras**	**AMINOÁCIDO**
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Ácido aspártico
N	Asn	Asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp

SÍMBOLO		
1-Letra	**3-Letras**	**AMINOÁCIDO**
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

Debe observarse que todas las secuencias de residuos de aminoácidos representadas en el presente documento por fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de terminal amino a terminal carboxilo. Además, la frase "residuo de aminoácido" se define ampliamente para incluir los aminoácidos enumerados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 2) y aminoácidos modificados e inusuales, como los mencionados en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822. Además, debe tenerse en cuenta que un guión al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos, a un grupo amino-terminal como NH_2 o a un grupo terminal carboxilo tal como COOH.

Como se usa en el presente documento, los "aminoácidos de ocurrencia natural" se refieren a los 20 L-aminoácidos que se encuentran en los polipéptidos.

Como se usa en el presente documento, "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico que no es uno de los aminoácidos de ocurrencia natural listados en la Tabla 2. Aminoácidos de ocurrencia no natural, por lo tanto, incluyen, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos de ocurrencia natural e incluyen, pero no se limitan a, los D-isostereómeros de aminoácidos. Los expertos en la técnica conocen aminoácidos no naturales ejemplares y pueden incluirse en un polipéptido de factor IX modificado.

Para los propósitos de este documento, se pueden hacer sustituciones conservadoras de aminoácidos en cualquiera de los polipéptidos y dominios de los mismos, siempre que la proteína resultante exhiba una actividad de un FIX. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos, como las establecidas en la Tabla 2B, son aquellas que no eliminan la actividad proteolítica. Los expertos en esta técnica conocen sustituciones conservadoras adecuadas de aminoácidos y pueden hacerse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224). También se incluye dentro de la definición, el fragmento catalíticamente activo de un MTSP, particularmente una porción de proteasa de cadena sencilla. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se realizan, por ejemplo, de acuerdo con las establecidas en la Tabla 2B como sigue:

Tabla 2B

Residuo original	Sustitución conservadora
Ala (A)	Gly; Ser, Abu
Arg (R)	Lys, orn
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gin (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val; Met; Nle; Nva
Leu (L)	Ile; Val; Met; Nle; Nv
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile; NLe Val
Ornitina	Lys; Arg
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser

Residuo original	Sustitución conservadora
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Nle; Nv

Otras sustituciones también son permisibles y pueden determinarse empíricamente o de acuerdo con sustituciones conservadoras conocidas.

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

Como se usa en el presente documento, 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 especificado es una porción de una molécula de ADN más larga, como un plásmido o fragmento de plásmido, que, cuando se lee desde la dirección 5' a 3', codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.

Como se usa en el presente documento, el término polinucleótido significa un polímero de desoxirribonucleótidos o bases de ribonucleótidos de cadena sencilla o de cadena doble leído desde el extremo 5' hasta el 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizadas in vitro o preparadas a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula de polinucleótido se da aquí en términos de nucleótidos (abreviado “nt”) o pares de bases (abreviado “bp”). El término nucleótidos se usa para moléculas de cadena sencilla y de cadena doble donde el contexto lo permite. Cuando el término se aplica a moléculas de cadena doble, se usa para denotar la longitud total y se entenderá que es equivalente al término pares de bases. Los expertos en la materia reconocerán que las dos cadenas de un polinucleótido de cadena doble pueden diferir ligeramente en longitud y que sus extremos pueden escalonarse; así, todos los nucleótidos dentro de una molécula polinucleotídica de cadena doble no pueden ser emparejados. Tales extremos no emparejados, en general, no excederán 20 nucleótidos de longitud.

Como se usa en el presente documento, “secuencia primaria” se refiere a la secuencia de residuos de aminoácidos en un polipéptido.

Como se usa en este documento, “similitud” entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud puede basarse en el grado de identidad y/o homología de secuencias de residuos y los residuos contenidos en ellas. Los expertos en la materia conocen métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, en un método para evaluar la similitud de secuencia, dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se alinean de una manera que produce un nivel máximo de identidad entre las secuencias. “Identidad” se refiere al grado en que las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son invariables. La alineación de las secuencias de aminoácidos, y en cierta medida las secuencias de nucleótidos, también puede tener en cuenta las diferencias conservadoras y/o las sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservadoras son aquellas que preservan las propiedades fisicoquímicas de los residuos involucrados. Las alineaciones pueden ser globales (alineación de las secuencias comparadas en toda la longitud de las secuencias e incluir todos los residuos) o locales (la alineación de una porción de las secuencias que incluye solo la región o regiones más similares).

Como se usa en el presente documento, los términos “homología” e “identidad” se usan indistintamente, pero la homología para proteínas puede incluir cambios conservadores de aminoácidos. En general, para identificar las posiciones correspondientes, las secuencias de aminoácidos se alinean de modo que se obtiene la coincidencia de orden más alto (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, AM, ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, DW, ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, AM y Griffin, HG, eds., Humana Press, Nueva 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, Nueva York, 1991; Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073).

Como se usa en el presente documento, “identidad de secuencia” se refiere al número de aminoácidos (o bases de nucleótidos) idénticos en una comparación entre una prueba y un polipéptido o polinucleótido de referencia. Los polipéptidos homólogos se refieren a un número predeterminado de residuos de aminoácidos idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones conservadoras de aminoácidos, así como residuos idénticos. La identidad de secuencia se puede determinar mediante programas de algoritmos de alineación estándar utilizados con penalizaciones de brecha predeterminadas establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico homólogas se refieren a un número predeterminado de nucleótidos idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones que no cambian el aminoácido codificado (es decir, “sustituciones silenciosas”) así como residuos idénticos. Las moléculas de ácido

nucleico sustancialmente homólogas se hibridan típicamente con rigurosidad moderada o alta rigurosidad a lo largo de toda la longitud del ácido nucleico o al menos aproximadamente 70%, 80% o 90% de la molécula de ácido nucleico de longitud completa de interés. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula de ácido nucleico hibridante. (Para la determinación de la homología de las proteínas, se pueden alinear aminoácidos conservadores y aminoácidos idénticos; en este caso, el porcentaje de identidad y el porcentaje de homología varían). Si dos moléculas de ácido nucleico tienen secuencias de nucleótidos (o cualquiera de los dos polipéptidos tienen secuencias de aminoácidos) que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% "idénticas" se pueden determinar utilizando algoritmos informáticos conocidos, como el programa "FAST A", utilizando, por ejemplo, los parámetros predeterminados como en Pearson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988) (otros programas incluyen el paquete de programas 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 función BLAST de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica se puede utilizar para determinar la identidad. Otros programas comerciales o públicamente disponibles incluyen el programa DNAStar "MegAlign" (Madison, WI) y el programa "Gap" (Madison WI) del Grupo de Computación Genética de la Universidad de Wisconsin (UWG). El porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico se puede determinar, por ejemplo, comparando la información de secuencia usando un programa informático GAP (por ejemplo, Needleman et al. J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), como se revisó por Smith y Waterman (Adv. ApplMath. 2: 482 (1981)). Brevemente, un programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, divididos por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros predeterminados para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov et al. Nucl. Acids Res. 14: 6745 (1986), según lo descrito por Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3.0 por cada brecha y una penalización adicional de 0.10 por cada símbolo en cada brecha, y (3) sin penalización por brechas finales.

Por lo tanto, como se usa en el presente documento, el término "identidad" representa una comparación entre una prueba y un polipéptido o polinucleótido de referencia. En un ejemplo no limitativo, "al menos 90% idéntico a" se refiere a identidades porcentuales de 90 a 100% con respecto a los polipéptidos de referencia. La identidad a un nivel de 90% o más es indicativo del hecho de que, suponiendo, por ejemplo, una prueba y una longitud de polinucleótido de referencia de 100 aminoácidos, no se comparan más del 10% (es decir, 10 de 100) de aminoácidos en el polipéptido de prueba difiere de aquellos de los polipéptidos de referencia. Se pueden hacer comparaciones similares entre una prueba y polinucleótidos de referencia. Dichas diferencias pueden representarse como mutaciones puntuales distribuidas aleatoriamente en toda la longitud de una secuencia de aminoácidos o pueden agruparse en una o más ubicaciones de longitud variable hasta el máximo permitido, por ejemplo, 10/100 diferencia de aminoácidos (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácidos nucleicos o aminoácidos. En el nivel de homologías o identidades superiores al 85-90%, el resultado debe ser independiente del programa y de los parámetros de brecha establecidos; tales altos niveles de identidad se pueden evaluar fácilmente, a menudo sin depender del software.

Como se usa en el presente documento, también se entiende que los términos "sustancialmente idénticos" o "similares" varían con el contexto tal como lo entienden los expertos en la técnica relevante, pero que los expertos pueden evaluarlos.

Como se usa en este documento, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similitud y/o identidad) para alinear las posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Típicamente, dos o más secuencias que están relacionadas en un 50% o más de identidad están alineadas. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias que están alineadas en las posiciones correspondientes y pueden incluir secuencias de alineación derivadas de ARN, tales como EST y otros ADNc, alineados con la secuencia de ADN genómico.

Como se usa en el presente documento, " específicamente se hibrida" se refiere a hibridar, mediante emparejamiento de bases complementario, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) a una molécula de ácido nucleico diana. Los expertos en la materia están familiarizados con los parámetros in vitro e in vivo que afectan la hibridación específica, como la longitud y la composición de la molécula particular. Los parámetros particularmente relevantes para la hibridación in vitro incluyen además hibridación y temperatura de lavado, composición de tampón y concentración de sal. Las condiciones de lavado ejemplares para eliminar moléculas de ácido nucleico unidas de forma no específica a alta rigurosidad son 0.1 x SSPE, SDS al 0.1%, 65°C, y a rigurosidad media son 0.2 x SSPE, SDS al 0.1%, 50°C. Se conocen condiciones de rigurosidad equivalentes en la técnica. 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 diana apropiada para una aplicación particular.

Como se usa en el presente documento, el polipéptido o proteína aislada o purificada o la porción biológicamente activa del mismo está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula de tejido de la que deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetizan químicamente. Se puede determinar que las preparaciones son sustancialmente libres si ellas parecen libres de impurezas fácilmente detectables según lo determinado por los métodos de análisis estándar, como la cromatografía en

capa fina (TLC), la electroforesis en gel y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizada por aquellos expertos en la técnica para evaluar dicha pureza, o suficientemente pura de modo que una purificación adicional no altere de manera detectable las propiedades físicas y químicas, tales como las actividades proteolíticas y biológicas, de la sustancia. Los expertos en la técnica conocen métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros. Sin embargo, un compuesto sustancialmente químicamente puro puede ser una mezcla de estereoisómeros. En tales casos, la purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

El término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de forma recombinante. En una realización, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas proteasas que tienen menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de proteínas no proteasas (también denominadas en este documento como una proteína contaminante), generalmente menos de aproximadamente el 20% de proteínas no proteasas o 10% de proteínas no proteasas o menos de aproximadamente 5% de proteínas no proteasas. Cuando la proteína proteasa o la porción activa de la misma se produce de manera recombinante, también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de, aproximadamente, o igual al 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína proteasa.

Como se usa en el presente documento, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos incluye preparaciones de proteínas proteasas en las que la proteína se separa de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. El término incluye preparaciones de proteínas proteasas que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco), 20%, 10%, 5% o menos de precursores químicos o componentes o sustancias químicas no proteasas.

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

Como se usa en el presente documento, el vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se usan para introducir ácido nucleico heterólogo en las células para su expresión o replicación. Los vectores típicamente permanecen episómicos, pero pueden diseñarse para efectuar la integración de un gen o una porción del mismo en un cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamíferos. La selección y el uso de tales vehículos son bien conocidos por los expertos en la materia.

Como se usa en el presente documento, la expresión se refiere al proceso mediante el cual el ácido nucleico se transcribe en ARNm y se traduce en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el ácido nucleico se deriva del ADN genómico, la expresión puede, si se selecciona una célula u organismo huésped eucariota apropiado, incluye el procesamiento, como el empalme del ARNm.

Como se usa en el presente documento, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que está operativamente enlazado con secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de dichos fragmentos de ADN. Dichos segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación y similares. Los vectores de expresión se derivan generalmente de ADN plasmídico 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, como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que, tras la introducción en una célula huésped apropiada, da como resultado la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen aquellos que son replicables en células eucariotas y/o células procariotas y aquellos que permanecen episómicos o aquellos que se integran en el genoma de la célula huésped.

Como se usa en el presente documento, el vector también incluye “vectores de virus” o “vectores virales”. Los vectores virales son virus diseñados que están unidos operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o lanzaderas) los genes exógenos a las células.

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

Como se usa en el presente documento, el ADN desnudo se refiere al ADN libre de histonas que puede usarse para vacunas y terapia génica. El ADN desnudo es el material genético que se pasa de una célula a otra durante una transferencia de genes procesada llamada transformación o transfección. En la transformación o transfección, el ADN purificado o desnudo que es absorbido por la célula receptora le dará a la célula receptora una nueva característica o fenotipo.

Como se usa en el presente documento, enlazado operablemente u operativamente cuando se hace referencia a segmentos de ADN significa que los segmentos están dispuestos de manera que funcionan en concierto para los fines previstos, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y continúa a través del segmento de codificación hasta el terminador.

Como se usa en el presente documento, un agente que modula la actividad de una proteína o la expresión de un gen o ácido nucleico disminuye o aumenta o de otra manera altera la actividad de la proteína o, de alguna manera, regula hacia arriba o hacia abajo o de otra manera altera la expresión del ácido nucleico en una célula.

Como se usa en el presente documento, una “proteína quimérica” o “proteína de fusión” se refiere a un polipéptido enlazado operativamente a un polipéptido diferente. Una proteína quimérica o de fusión proporcionada en el presente documento puede incluir uno o más polipéptidos FIX, o una porción de los mismos, y uno o más de otros polipéptidos para cualquiera o más de las señales de control transcripcional/traduccional, secuencias de señal, una etiqueta para localización, una etiqueta para purificación, parte de un dominio de una inmunoglobulina G, y/o un agente enfocado. Un polipéptido FIX quimérico también incluye aquellos que tienen sus dominios o regiones endógenas del polipéptido intercambiados con otro polipéptido. Estas proteínas quiméricas o de fusión incluyen las producidas por medios recombinantes como proteínas de fusión, aquellas producidas por medios químicos, tales como el acoplamiento químico, mediante, por ejemplo, el acoplamiento a grupos sulfhidrilo, y las producidas por cualquier otro método mediante el cual al menos un polipéptido (es decir, FIX), o una porción del mismo, está enlazada, directa o indirectamente a través de enlazador(es) a otro polipéptido.

Como se usa en el presente documento, enlazado operativamente cuando se refiere a una proteína de fusión se refiere a un polipéptido de proteasa y un polipéptido sin proteasa que se fusionan en el marco entre sí. El polipéptido no proteasa puede fusionarse con el extremo N o el extremo C del polipéptido proteasa.

Como se usa en el presente documento, un agente de enfocado, es cualquier fracción, tal como una proteína o porción efectiva de la misma, que proporciona unión específica a una molécula de la superficie celular, tal receptor de la superficie celular, que en algunos casos puede internalizar un conjugado unido o porción del mismos. Un agente de enfocado también puede ser uno que promueva o facilite, por ejemplo, el aislamiento de afinidad o la purificación del conjugado; fijación del conjugado a una superficie; o detección del conjugado o complejos que contienen el conjugado.

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

Como se usa en el presente documento, “enfermedad o trastorno” se refiere a una afección patológica en un organismo que resulta de una causa o afección que incluye, pero no se limita a, infecciones, afecciones adquiridas, afecciones genéticas y caracterizadas por síntomas identificables. Las enfermedades y trastornos de interés en el presente documento son aquellas que implican la coagulación, incluidas las mediadas por proteínas de coagulación y aquellas en las que las proteínas de coagulación juegan un papel en la etiología o patología. Las enfermedades y trastornos también incluyen aquellos que son causados por la ausencia de una proteína tal como en la hemofilia, y de particular interés en el presente documento son aquellos trastornos en los que no se produce la coagulación debido a una deficiencia de defecto en una proteína de coagulación.

Como se usa en el presente documento, “procoagulante” se refiere a cualquier sustancia que promueve la coagulación de la sangre.

Como se usa en este documento, “anticoagulante” se refiere a cualquier sustancia que inhibe la coagulación de la sangre como se usa en este documento, “hemofilia” se refiere a un trastorno hemorrágico causado por una deficiencia en los factores de coagulación de la sangre. La hemofilia puede ser el resultado, por ejemplo, de ausencia, expresión reducida o función reducida de un factor de coagulación. El tipo más común de hemofilia es la hemofilia A, que resulta de una deficiencia en el factor VIII. El segundo tipo más común de hemofilia es la hemofilia B, que resulta de una deficiencia en el factor IX. La hemofilia C, también llamada deficiencia de FXI, es una forma más leve y menos común de hemofilia.

Como se usa en el presente documento, “hemofilia congénita” se refiere a tipos de hemofilia que se heredan. La hemofilia congénita resulta de la mutación, deleción, inserción u otra modificación de un gen del factor de coagulación en el que la producción del factor de coagulación está ausente, reducida o no es funcional. Por ejemplo, las mutaciones hereditarias en los genes del factor de coagulación, tal como el factor VIII y el factor IX, producen hemofilia congénita, hemofilia A y B, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, “hemofilia adquirida” se refiere a un tipo de hemofilia que se desarrolla en la edad adulta a partir de la producción de autoanticuerpos que inactivan el FVIII.

Como se usa en el presente documento, “trastorno hemorrágico” se refiere a una afección en la que el sujeto tiene una capacidad disminuida para controlar la hemorragia. Los trastornos hemorrágicos pueden ser heredados o adquiridos, y

pueden resultar de, por ejemplo, defectos o deficiencias en la ruta de coagulación, defectos o deficiencias en la actividad plaquetaria, o defectos vasculares.

Como se usa en el presente documento, “trastorno hemorrágico adquirido” se refiere a trastornos hemorrágicos que resultan de deficiencias de coagulación causadas por afecciones tales como enfermedad hepática, deficiencia de vitamina K o coumadina (warfarina) u otra terapia anticoagulante.

Como se usa en el presente documento, “tratar” a un sujeto que tiene una enfermedad o afección significa que un polipéptido, composición u otro producto proporcionado en el presente documento se administra al sujeto.

Como se usa en el presente documento, un agente terapéutico, régimen terapéutico, radioprotector o quimioterapéutico significa fármacos convencionales y terapias farmacológicas, incluidas vacunas, que son conocidas por los expertos en la técnica. Los agentes radioterapéuticos son bien conocidos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, tratamiento significa cualquier manera en que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad se mejoran o se alteran beneficiosamente de otra manera. Por lo tanto, el tratamiento abarca profilaxis, terapia y/o cura. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de las composiciones de la presente memoria. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de un FIX modificado y las composiciones proporcionadas en este documento.

Como se usa en este documento, la mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno particular mediante un tratamiento, tal como mediante la administración de una composición farmacéutica u otra terapéutica, se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que puede atribuirse o asociarse con la administración de la composición o terapéutica.

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

Como se usa en el presente documento, una cantidad eficaz de un compuesto o composición para tratar una enfermedad particular es una cantidad que es suficiente para mejorar, o de alguna manera reducir los síntomas asociados con la enfermedad. Dicha cantidad puede administrarse como una dosis única o puede administrarse de acuerdo con un régimen, por lo que es eficaz. La cantidad puede curar la enfermedad, pero, típicamente, se administra para mejorar los síntomas de la enfermedad. Típicamente, se requiere la administración repetida para lograr una mejoría deseada de los síntomas.

Como se usa en el presente documento, “cantidad terapéuticamente eficaz” o “dosis terapéuticamente eficaz” 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, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

Como se usa en el presente documento, “paciente” o “sujeto” a tratar incluye humanos y animales no humanos, incluidos mamíferos. Los mamíferos incluyen primates, como humanos, chimpancés, gorilas y monos; animales domesticados, como perros, caballos, gatos, cerdos, cabras, vacas; y roedores como ratones, ratas, hámsters y jerbos.

Como se usa en el presente documento, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o entre más elementos. La asociación puede ser espacial o referirse al uso de los dos o más elementos para un propósito común.

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

Como se usa en el presente documento, un “artículo de fabricación” es un producto que se fabrica y se vende. Como se usa a lo largo de esta solicitud, el término pretende abarcar polipéptidos de proteasa modificados y ácidos nucleicos contenidos en artículos de embalaje.

Como se usa en este documento, fluido se refiere a cualquier composición que pueda fluir. Por lo tanto, los fluidos abarcan composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones similares.

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

Como se usa en el presente documento, el anticuerpo incluye fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab, que están compuestos por una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada.

Como se usa en este documento, un receptor se refiere a una molécula que tiene afinidad por un ligando particular. Los receptores pueden ser moléculas de ocurrencia natural o sintética. Los receptores también pueden denominarse en la técnica como antiligandos.

Como se usa en el presente documento, animal incluye cualquier animal, tal como, pero no limitado a; primates, incluidos humanos, gorilas y monos; roedores, como ratones y ratas; aves, como pollos; rumiantes, como cabras, vacas, venados, ovejas; ovinos, como los cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen a los humanos como el animal contemplado. Las proteasas proporcionadas en el presente documento son de cualquier fuente, animal, vegetal, procariota y fúngico.

Como se usa en el presente documento, la terapia génica implica la transferencia de ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, a ciertas células, células diana, de un mamífero, particularmente un ser humano, con un trastorno o afección para la cual se busca dicha terapia. El ácido nucleico, como el ADN, se introduce en las células diana seleccionadas, como directamente o en un vector u otro vehículo de suministro, de tal manera que el ácido nucleico heterólogo, como el ADN, se expresa y se produce un producto terapéutico codificado de este modo. Alternativamente, el ácido nucleico heterólogo, como el ADN, puede mediar de alguna manera la expresión de ADN que codifica el producto terapéutico, o puede codificar un producto, como un péptido o ARN que de alguna manera media, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. La terapia genética también puede usarse para administrar ácido nucleico que codifica un producto génico que reemplaza un gen defectuoso o complementa un producto génico producido por el mamífero o la célula en la que se introduce. El ácido nucleico introducido puede codificar un compuesto terapéutico, tal como una proteasa o proteasa modificada, que normalmente no se produce en el huésped mamífero o que no se produce en cantidades terapéuticamente eficaces o en un momento terapéuticamente útil. El ácido nucleico heterólogo, como el ADN, que codifica el producto terapéutico se puede modificar antes de la introducción en las células del huésped afectado para mejorar o alterar de otro modo el producto o la expresión del mismo. La terapia génica también puede implicar la administración de un inhibidor o represor u otro modulador de la expresión génica.

Como se usa en el presente documento, el ácido nucleico heterólogo es un ácido nucleico que normalmente no se produce in vivo por la célula en la que se expresa o que se produce por la célula, pero está en un locus diferente o se expresa de manera diferente o que media o codifica mediadores que alteran la expresión de ácido nucleico endógeno, como el ADN, al afectar la transcripción, la traducción u otros procesos bioquímicos regulables. El ácido nucleico heterólogo generalmente no es endógeno a la célula en la que se introduce, sino que se ha obtenido de otra célula o se ha preparado sintéticamente. El ácido nucleico heterólogo puede ser endógeno, pero es un ácido nucleico que se expresa desde un locus diferente o se altera en su expresión. Generalmente, aunque no necesariamente, dicho ácido nucleico codifica ARN y proteínas que normalmente no son producidas por la célula o de la misma manera en la célula en la que se expresa. El ácido nucleico heterólogo, como el ADN, también puede denominarse ácido nucleico extraño, como el ADN. Por lo tanto, el ácido nucleico heterólogo o el ácido nucleico extraño incluyen una molécula de ácido nucleico que no está presente en la orientación o posición exacta a medida que la molécula de ácido nucleico contraparte, como el ADN, se encuentra en un genoma. También puede referirse a una molécula de ácido nucleico de otro organismo o especie (es decir, exógena).

Cualquier ácido nucleico, tal como ADN, que un experto en la técnica reconocería o consideraría heterólogo o extraño a la célula en la que se expresa el ácido nucleico está aquí abarcado por el ácido nucleico heterólogo; el ácido nucleico heterólogo incluye ácido nucleico agregado de forma exógena que también se expresa de manera endógena. Los ejemplos de ácido nucleico heterólogo incluyen, pero no se limitan a, ácido nucleico que codifica proteínas marcadoras trazables, como una proteína que confiere resistencia a fármacos, ácido nucleico que codifica sustancias terapéuticamente eficaces, como agentes anticancerígenos, enzimas y hormonas, y ácido nucleico, como el ADN, que codifica otros tipos de proteínas, como los anticuerpos. Los anticuerpos codificados por el ácido nucleico heterólogo pueden secretarse o expresarse en la superficie de la célula en la que se ha introducido el ácido nucleico heterólogo.

Como se usa en el presente documento, un producto terapéuticamente eficaz para la terapia génica es un producto que está codificado por ácido nucleico heterólogo, típicamente ADN, que, tras la introducción del ácido nucleico en un huésped, se expresa un producto que mejora o elimina los síntomas, manifestaciones de una enfermedad hereditaria o adquirida o que cura la enfermedad. También se incluyen moléculas de ácido nucleico biológicamente activas, como RNAi y antisentido.

Como se usa en el presente documento, la cita de que un polipéptido “consiste esencialmente” en una secuencia citada de aminoácidos significa que solo está presente la porción citada, o un fragmento del mismo, del polipéptido de longitud completa. El polipéptido puede incluir opcionalmente, y generalmente incluirá aminoácidos adicionales de otra fuente o puede insertarse en otro polipéptido

Como se usa en este documento, las formas singulares “un”, “una” y “el” incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente 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 en el presente documento, los intervalos y cantidades pueden expresarse como “aproximadamente” un valor o intervalo particular. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto, “aproximadamente 5 bases” significa “aproximadamente 5 bases” y también “5 bases”.

Como se usa en el presente documento, “opcional” u “opcionalmente” significa que el evento o circunstancia posteriormente descrito ocurre o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho evento o circunstancia ocurre y casos en los que no ocurre. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo no está sustituido o está sustituido.

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

B. Hemostasia y papel del Factor IX en el mismo

Se proporcionan en la presente memoria polipéptidos de Factor IX modificado (FIX) de acuerdo con las reivindicaciones, que incluyen polipéptidos FIXa modificados y fragmentos catalíticamente activos de los mismos. Los polipéptidos del factor IX juegan un papel en la regulación y el proceso de la hemostasia y, por lo tanto, pueden usarse como agentes terapéuticos. La entrega efectiva de proteínas terapéuticas como FIX para uso clínico es un desafío importante para la ciencia farmacéutica. Una vez en el torrente sanguíneo, estas proteínas se eliminan constantemente de la circulación en poco tiempo por diferentes procesos fisiológicos, que involucran el metabolismo y la depuración utilizando rutas normales para la eliminación de proteínas, como la filtración (glomerular) en los riñones o la proteólisis en la sangre. Una vez en el tracto gastrointestinal luminal, estas proteínas son constantemente digeridas por proteasas luminales. Este último puede ser un proceso limitante que afecta la vida media de las proteínas utilizadas como agentes terapéuticos en la inyección intravenosa. Además, los inhibidores en la sangre pueden inhibir específicamente la actividad de la proteína terapéutica. Por ejemplo, la antitrombina (AT-III), la heparina y el complejo AT-III/heparina pueden inhibir la actividad coagulante de FIX. Se necesitan variantes más eficaces de FIX con propiedades mejoradas, que incluyen propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas mejoradas, mayor actividad catalítica y/o mayor resistencia a los inhibidores.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento exhiben propiedades mejoradas, que incluyen propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como una vida media en suero incrementada; mayor resistencia a los inhibidores, como la antitrombina III (AT-III), la heparina y el complejo AT-III/heparina; aumento de la actividad catalítica; o cualquier combinación de los mismos. Por lo tanto, se proporcionan polipéptidos FIX modificados que tienen una actividad coagulante incrementada. Por consiguiente, estos polipéptidos tienen una variedad de usos y aplicaciones, por ejemplo, como agentes terapéuticos para modular la hemostasia. La siguiente discusión proporciona una revisión del proceso de coagulación y el papel del Factor IX en este proceso, antes de una discusión del factor IX y sus modificaciones.

La hemostasia es el mecanismo fisiológico que frena la hemorragia que resulta de la lesión de la vasculatura. La hemostasia normal depende de los componentes celulares y las proteínas plasmáticas solubles, e involucra una serie de eventos de señalización que finalmente conducen a la formación de un coágulo sanguíneo. La coagulación se inicia rápidamente después de que se produce una lesión en el vaso sanguíneo y se dañan las células endoteliales. En la fase primaria de la coagulación, las plaquetas se activan para formar un tapón hemostático en el sitio de la lesión. Sigue la hemostasia secundaria que involucra factores de coagulación del plasma, que actúan en una cascada proteolítica que resulta en la formación de hebras de fibrina que fortalecen el tapón de plaquetas.

Tras la lesión del vaso, el flujo sanguíneo al área lesionada inmediata está restringido por la constricción vascular permitiendo que las plaquetas se adhieran al colágeno fibrilar recién establecido en el tejido conectivo subendotelial. Esta adhesión depende del factor von Willebrand (vWF), que se une al endotelio dentro de los tres segundos posteriores a la lesión, lo que facilita la adhesión y agregación plaquetaria. La activación de las plaquetas agregadas resulta en la secreción de una variedad de factores, que incluyen ADP, ATP, tromboxano y serotonina. También se liberan moléculas de adhesión, fibrinógeno, vWF, trombospondina y fibronectina. Dicha secreción promueve la adhesión adicional y la agregación de plaquetas, el aumento de la activación de plaquetas y la constricción de los vasos sanguíneos, y la exposición de fosfolípidos aniónicos en la superficie de las plaquetas que sirven como plataformas para el ensamblaje de complejos de enzimas de coagulación sanguínea. Las plaquetas cambian de forma y conducen a la formación de pseudopodios, lo que facilita aún más la agregación a otras plaquetas, lo que resulta en un tapón de plaquetas suelto.

Se inicia simultáneamente una cascada de peptidasas de coagulación (la cascada de coagulación). La cascada de coagulación implica una serie de eventos de activación que implican la división proteolítica. En tal cascada, una proteína inactiva de una serina proteasa (también llamada zimógeno) se convierte en una proteasa activa mediante la división de uno o más enlaces peptídicos, que luego sirve como la proteasa activadora para la próxima molécula de zimógeno en la

cascada, en última instancia resultando en la formación de coágulos por la reticulación de la fibrina. Por ejemplo, la cascada genera moléculas activadas como la trombina (de la división de la protrombina), que activa aún más las plaquetas, y también genera fibrina a partir de la división del fibrinógeno. La fibrina luego forma un polímero reticulado alrededor del tapón de plaquetas para estabilizar el coágulo. Tras la reparación de la lesión, la fibrina es digerida por el sistema fibrinolítico, cuyos componentes principales son el plasminógeno y el activador de plasminógeno de tipo tisular (tPA). Ambas proteínas se incorporan a la fibrina polimerizante, donde interactúan para generar plasmina, que, a su vez, actúa sobre la fibrina para disolver el coágulo preformado. Durante la formación de coágulos, los inhibidores del factor de coagulación también circulan a través de la sangre para evitar la formación de coágulos más allá del sitio de la lesión.

La interacción del sistema, desde la lesión hasta la formación de coágulos y la posterior fibrinólisis, se describe a continuación.

1. Adhesión plaquetaria y agregación

La coagulación de la sangre se evita activamente en condiciones normales. El endotelio vascular soporta la vasodilatación, inhibe la adhesión y activación plaquetaria, suprime la coagulación, mejora la división de la fibrina y es de carácter antiinflamatorio. Las células endoteliales vasculares secretan moléculas como el óxido nitroso (NO) y la prostacilina, que inhiben la agregación plaquetaria y dilatan los vasos sanguíneos. La liberación de estas moléculas activa las guanilatociclasas solubles (sGC) y la proteína quinasa I dependiente de cGMP (cGKI) y aumenta los niveles de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), que causan la relajación del músculo liso en la pared del vaso. Además, las células endoteliales expresan ADPasas de la superficie celular, como CD39, que controlan la activación y agregación plaquetaria al convertir el ADP liberado de las plaquetas en inhibidores de las plaquetas de nucleótidos 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 mediante la expresión de receptores de plasminógeno (anexina II) y uroquinasa, así como la secreción de activadores de plasminógeno de tipo tejido y uroquinasa, todos los cuales promueven la eliminación del coágulo. En una capa final de regulación protrombótica, las células endoteliales desempeñan un papel activo en la inhibición de la cascada de coagulación al producir heparán sulfato, que aumenta la cinética de la inhibición de antitrombina III de la trombina y otros factores de coagulación.

Sin embargo, bajo trauma vascular agudo, predominan los mecanismos vasoconstrictores y el endotelio se vuelve de naturaleza protrombótica, procoagulatoria y proinflamatoria. Esto se logra mediante una reducción de los agentes dilatadores endoteliales: adenosina, NO y prostaciclina; y la acción directa de ADP, serotonina y tromboxano sobre las células vasculares del músculo liso para provocar su contracción (Becker, Heindl et al. 2000). El desencadenante principal del cambio en la función endotelial que conduce a la formación de trombos hemostáticos es la pérdida de la barrera de células endoteliales entre la sangre y los componentes de la matriz extracelular (MEC) (Ruggeri (2002) Nat Med 8: 1227-1234). Las plaquetas circulantes identifican y discriminan áreas de lesiones endoteliales y se adhieren al subendotelio establecido. Su interacción con los diversos sustratos trombogénicos y agonistas liberados o generados localmente da como resultado la activación plaquetaria. Este proceso se describe como poseedor de dos etapas, 1) adhesión: el anclaje inicial a una superficie, y 2) agregación: la cohesión 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 establecido a través de la interacción con proteínas de unión a colágeno en la superficie celular, y a través de la interacción con 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 hacia el torrente sanguíneo. El vWF también se une al factor VIII, que es importante en la estabilización del factor VIII y su supervivencia en la circulación.

La adhesión de plaquetas y la activación posterior se logra cuando vWF se une a través de su dominio A1 a GPIb (parte del complejo receptor de glucoproteína plaquetaria GPIb-IX-V). La interacción entre vWF y GPIb está regulada por la fuerza de corte de tal manera que un aumento en el esfuerzo de corte da como resultado un aumento correspondiente en la afinidad de vWF por GPIb. La integrina α1β2, también conocida en leucocitos como VLA-2, es el principal receptor de colágeno en las plaquetas, y el compromiso a través de este receptor genera las señales intracelulares que contribuyen a la activación plaquetaria. La unión a través de α1β2 facilita el compromiso del receptor de colágeno de menor afinidad, GP VI. Esta es parte de la superfamilia de inmunoglobulinas y es el receptor que genera las señales intracelulares más potentes para la activación plaquetaria. La activación plaquetaria produce la liberación de adenosina difosfato (ADP), que se convierte en tromboxano A2.

La activación plaquetaria también da como resultado la expresión en la superficie de los receptores de glucoproteína plaquetaria IIb-IIIa (GP IIb-IIIa), también conocidos como integrina plaquetaria αIIbβ3. Los receptores GP IIb-IIIa permiten la adherencia de las plaquetas entre sí (es decir, la agregación) en virtud de las moléculas de fibrinógeno que enlazan las plaquetas a través de estos receptores. Esto da como resultado la formación de un tapón de plaquetas en el sitio de la lesión para ayudar a prevenir una mayor pérdida de sangre, mientras que el tejido vascular dañado libera factores que inician la cascada de coagulación y la formación de una malla estabilizadora de fibrina alrededor del tapón de plaquetas.

2. Cascada de coagulación

La ruta de coagulación es una ruta proteolítica donde cada enzima está presente en el plasma como un zimógeno, o forma inactiva. La división del zimógeno está regulada para liberar la forma activa de la molécula precursora. La ruta funciona como una serie de circuitos de retroalimentación positiva y negativa que controlan el proceso de activación, donde el objetivo final es producir trombina, que luego puede convertir el fibrinógeno soluble en fibrina para formar un coágulo. Los factores de coagulación y otras proteínas participan en la coagulación de la sangre a través de una o más de las rutas intrínseca, extrínseca o común de la coagulación. Como se discute a continuación, estas vías están interconectadas y la coagulación de la sangre probablemente ocurre a través de un modelo de activación basado en células.

La generación de trombina se ha dividido históricamente en tres rutas, las rutas intrínseca (que sugiere que todos los componentes de la ruta son intrínsecos al plasma) y extrínseca (que sugiere que uno o más componentes de la ruta son extrínsecos al plasma) que proporcionan rutas alternativas para la generación del factor X activado (FXa), y la ruta común final que resulta en la formación de trombina (Figura 1). Estas rutas participan juntas en un proceso interconectado e interdependiente para efectuar la coagulación. Se desarrolló un modelo de coagulación basado en células que describe estas rutas (Figura 2) (Hoffman et al. (2001) Thromb Haemost 85: 958-965). En este modelo, las rutas “extrínseca” e “intrínseca” se efectúan en diferentes superficies celulares; la célula portadora del factor tisular (TF) y la plaqueta, respectivamente. El proceso de coagulación se separa en distintas fases, iniciación, amplificación y propagación, durante las cuales las rutas extrínsecas e intrínsecas funcionan en varias etapas para producir la gran explosión de trombina necesaria para convertir cantidades suficientes de fibrinógeno en fibrina para la formación de coágulos.

a. Iniciación

Se considera que FVII es el factor de coagulación responsable de iniciar la cascada de coagulación, cuya iniciación depende de su interacción con TF. TF es una glucoproteína transmembrana expresada por una variedad de células, como las células del músculo liso, fibroblastos, monocitos, linfocitos, granulocitos, plaquetas y células endoteliales. Las células mieloides y las células endoteliales solo expresan TF cuando son estimuladas, como las citocinas proinflamatorias. Las células del músculo liso y los fibroblastos, sin embargo, expresan TF constitutivamente. En consecuencia, una vez que estas células entran en contacto con el torrente sanguíneo después de una lesión tisular, la cascada de coagulación se inicia rápidamente mediante la unión de TF con el factor VII o FVIIa en el plasma. Los complejos TF/FVIIa se pueden formar mediante la unión directa de FVIIa a TF, o mediante la unión de FVII a TF y luego la activación posterior de FVII a FVIIa por una proteasa plasmática, tal como FXa, FIXa, FXIIa o FVIIa mismo. El complejo TF/FVIIa permanece anclado a la célula portadora de TF donde activa pequeñas cantidades de FX en FXa en lo que se conoce como la “ruta extrínseca” de la coagulación.

El complejo TF/FVIIa también divide pequeñas cantidades de FIX en FIXa. FXa se asocia con su cofactor FVa para también forman un complejo en la célula portadora de TF que luego puede convertir la protrombina en trombina. Sin embargo, la pequeña cantidad de trombina producida es inadecuada para soportar la formación de fibrina requerida para la coagulación completa. Además, cualquier FXa y FIXa activos son inhibidos en la circulación por la antitrombina III (AT-III) y otras serpinas, que se discuten con más detalle a continuación. Esto normalmente evitaría la formación de coágulos en la circulación. Sin embargo, en presencia de lesiones, el daño a la vasculatura da como resultado la agregación de plaquetas y la activación en este sitio de formación de trombina, lo que permite la amplificación de la señal de coagulación.

b. Amplificación

La amplificación tiene lugar cuando la trombina se une y activa las plaquetas. Las plaquetas activadas liberan FV de sus gránulos alfa, que se activan mediante trombina a FVa. La trombina también libera y activa FVIII del complejo FVIII/vWF en la membrana plaquetaria, y divide FXI en FXIa. Estas reacciones generan plaquetas activadas que tienen FVa, FVIIIa y FIXa en su superficie, lo que prepara el escenario para una gran explosión de generación de trombina durante la etapa de propagación.

C. Propagación

La propagación de la coagulación se produce en la superficie de grandes cantidades 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 donde se efectúa la ruta extrínseca. FXIa activa FIX a FIXa, que luego puede unirse con FVIIIa. Este proceso, además de las pequeñas cantidades de FIXa que se genera mediante la división de FIX por el complejo TF/FVIIa en la célula portadora de TF, genera una gran cantidad de FIXa en complejo con su cofactor, FVIIIa, calcio y una superficie de fosfolípidos adecuada. Este complejo se denomina complejo tenasa o Xasa, y divide y activa el Factor X (FX) en Factor Xa (FXa). Las moléculas FXa se unen a FVa para generar los complejos de protrombinasa que activan la protrombina a trombina. La trombina actúa en un circuito de retroalimentación positiva para activar aún más plaquetas e inicia nuevamente los procesos descritos para la fase de amplificación.

En breve, hay un número suficiente de plaquetas activadas con los complejos apropiados para generar la explosión de trombina que es lo suficientemente grande como 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 es dividido por la trombina, libera fibrinopéptido A y fibrinopéptido B. El fibrinopéptido B es luego dividido por la trombina, y los monómeros de fibrina formados por esta segunda división proteolítica forman espontáneamente un gel insoluble. La fibrina polimerizada se mantiene unida por fuerzas no covalentes y electrostáticas y se estabiliza por el factor de enzima transamidante XIIIa (FXIIIa), producido por la división de FXIII por la trombina. La trombina también activa TAFI, que inhibe la fibrinólisis al reducir la generación de plasmina en la superficie del coágulo. Además, la trombina misma se incorpora a la estructura del coágulo para una mayor estabilización. Estos agregados insolubles de fibrina (coágulos), junto con las plaquetas agregadas (trombos), bloquean los vasos sanguíneos dañados y evitan más hemorragias.

3. Regulación de la coagulación

Durante la coagulación, la cascada está regulada por procesos constitutivos y estimulados para inhibir la formación adicional de coágulos. La regulación es importante para a) limitar la isquemia de los tejidos mediante la formación de coágulos de fibrina, y b) prevenir la trombosis generalizada al localizar la formación de coágulos solo en el sitio de la lesión tisular.

La regulación se logra mediante las acciones de varias moléculas inhibidoras. Por ejemplo, la antitrombina III (AT-III) y el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI) funcionan constitutivamente para inhibir los factores en la cascada de la coagulación. El TFPI inhibe predominantemente el complejo FXa y FVIIa/TF. En contraste, AT-III, que es un inhibidor de la serina proteasa (serpina), inhibe predominantemente la trombina, FXa y FIXa. La inhibición de estos factores de coagulación por AT-III se ve potenciada en gran medida por la heparina, que se une a AT-III para inducir un cambio conformacional activador que acelera la reacción inhibitoria. La heparina también puede inhibir la actividad del complejo FIXa/FVIIIa de forma independiente de AT-III (Yuan et al., (2005) Biochemistry 44: 3615-3625). Un factor adicional, la proteína C, que se estimula a través de la activación plaquetaria, regula la coagulación mediante la división proteolítica y la inactivación de FVa y FVIIIa. La proteína S aumenta la actividad de la proteína C. Además, otro factor que contribuye a la inhibición de la coagulación es la proteína de membrana integral trombomodulina, que es producida por las células endoteliales vasculares y sirve como un receptor para la trombina. La unión de la trombina a la trombomodulina inhibe las 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 de fibrina reticulados en un coágulo se descomponen en polipéptidos solubles mediante plasmina, una serina proteasa. La plasmina puede generarse a partir de su plasminógeno precursor inactivo y reclutarse en el sitio de un coágulo de fibrina de dos maneras: por interacción con el activador de plasminógeno tisular (tPA) en la superficie de un coágulo de fibrina, y por interacción con el activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA) en una superficie celular. El primer mecanismo parece ser el principal responsable de la disolución de los coágulos dentro de los vasos sanguíneos. El segundo, aunque es capaz de mediar la disolución del coágulo, puede desempeñar un papel importante en la remodelación de tejidos, la migración celular y la inflamación.

La disolución del coágulo también está regulada de dos maneras. Primero, la activación eficiente de la plasmina y la fibrinólisis ocurren solo en complejos formados en la superficie del coágulo o en una membrana celular, mientras que las proteínas libres en la sangre son catalizadores ineficientes y se inactivan rápidamente. En segundo lugar, los activadores del plasminógeno y la plasmina son inactivados por moléculas como el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y PAI-2 que actúan sobre los activadores del plasminógeno, y α2-antiplasmina y α2-macroglobulina que inactivan la plasmina. En circunstancias normales, el equilibrio oportuno entre la coagulación y la fibrinólisis da como resultado la formación eficiente y la eliminación de coágulos después de una lesión vascular, al tiempo que previene episodios trombóticos o hemorrágicos no deseados.

C. Estructura y función del factor IX (FIX)

En este documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados con actividades o funciones mejoradas. FIX es un polipéptido que está involucrado en la cascada de coagulación. El papel de FIX en la cascada de coagulación está relacionado con su estructura y mecanismo de activación. Se entiende que la modulación de la coagulación por los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí también está vinculada a su estructura y mecanismo de activación. Estas características pueden ser las mismas que un polipéptido FIX no modificado. En otros casos, estas características pueden modificarse en un polipéptido FIX proporcionado en este documento, lo que da como resultado un polipéptido con actividades o propiedades alteradas o mejoradas. Por ejemplo, la modificación de un polipéptido FIX puede alterar una o más actividades de un polipéptido FIX. Por ejemplo, se proporcionan polipéptidos FIX modificados que exhiben niveles aumentados de glucosilación en comparación con un polipéptido FIX de tipo silvestre. Los polipéptidos FIX modificados pueden exhibir así propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como una depuración reducida y una vida media en suero aumentada en comparación con un polipéptido FIX de tipo silvestre, cuando se prueban usando ensayos in vivo. También se proporcionan polipéptidos FIX modificados que exhiben una mayor resistencia a los inhibidores, tales como AT-III, heparina y el complejo AT-III/heparina; y/o actividad catalítica incrementada. Por lo tanto, se proporcionan polipéptidos FIX modificados que exhiben propiedades terapéuticas mejoradas en comparación con un

polipéptido FIX no modificado. A continuación, se describe un resumen de las características estructurales y funcionales de los polipéptidos FIX y los polipéptidos FIX modificados.

El Factor IX es una serina proteasa dependiente de vitamina K y es un factor de coagulación importante en la hemostasia. Se sintetiza como un zimógeno de cadena sencilla en el hígado y circula en la sangre en este estado inactivo hasta que se activa como parte de la cascada de coagulación. Después de la activación del zimógeno FIX a FIX activado (FIXa) por FXIa o el complejo TF/FVIIa, FIXa se une a su cofactor, FVIIIa. El complejo resultante FIXa/FVIIIa se une y activa FX a FXa, continuando así la cascada de coagulación descrita anteriormente para establecer la hemostasia. La concentración de FIX en la sangre es de aproximadamente 4-5 mg/ml, y tiene una vida media de aproximadamente 18-24 horas.

La hemofilia B, también conocida como enfermedad Christmas o deficiencia del factor IX, es causada por una deficiencia o disfunción de FIX resultante de una o más de una variedad de mutaciones en el gen FIX. Si bien es menos frecuente que la hemofilia A, la hemofilia B sigue siendo una enfermedad importante en la cual las hemorragias articulares recurrentes pueden conducir a hipertrofia sinovial, sinovitis crónica, con destrucción de la sinovia, cartílago y hueso que conduce a dolor crónico, rigidez de las articulaciones y limitación del movimiento debido al daño articular severo progresivo. Las hemorragias musculares recurrentes también producen dolor agudo, hinchazón y limitación del movimiento, mientras que la hemorragia en otros sitios puede contribuir a la morbilidad y la mortalidad. El tratamiento es típicamente mediante terapia de reemplazo con FIX recombinante (rFIX). En el presente documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados que están diseñados para aumentar la actividad de coagulación tras la activación, y que pueden servir como agentes terapéuticos mejorados para tratar enfermedades y afecciones susceptibles de terapia con factor IX, como la hemofilia B.

1. Estructura FIX

El gen FIX humano se encuentra en el cromosoma X y tiene aproximadamente 34 kb de longitud con ocho exones. La transcripción FIX humana es de 2803 nucleótidos y contiene una región corta no traducida de 5', un marco de lectura abierto (incluido el codón de parada) de 1383 nucleótidos y una región no traducida de 3'. El marco de lectura abierto de 1383 nucleótidos (o ARNm de FIX; SEQ ID NO: 1) codifica un polipéptido precursor de 461 aminoácidos (número de acceso de Swiss-Prot P00740; SEQ ID NO: 2) que contiene un péptido señal N-terminal de 28 aminoácidos (aminoácidos 1-28 de SEQ ID NO: 2) que dirige el polipéptido del factor IX a la ruta secretora celular. Además del péptido señal hidrófobo, el polipéptido precursor FIX también contiene un propéptido de 18 aminoácidos (aa 29-46 de SEQ ID NO: 2) que, cuando se divide, libera el polipéptido maduro de 415 aminoácidos (SEQ ID NO: 3) que circula en la sangre como un zimógeno hasta la activación de FIXa. Además del péptido señal y el propéptido, el precursor FIX también contiene los siguientes segmentos y dominios: un dominio Gla (aa 47-92 de SEQ ID NO: 2, correspondiente a aa 1-46 de la proteína FIX madura establecida en SEQ ID NO: 3), dominio 1 similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (EGF1; aa 93-129 de SEQ ID NO: 2, correspondiente a aa 47-83 de la proteína FIX madura establecida en SEQ ID NO: 3), EGF2 (aa 130-171 de SEQ ID NO: 2, correspondiente a aa 84-125 de la proteína FIX madura establecida en SEQ ID NO: 3), una cadena ligera (aa 47-191 de SEQ ID NO: 2, correspondiente a aa 1-145 de la proteína FIX madura establecida en SEQ ID NO: 3), un péptido de activación (aa 192-226 de SEQ ID NO: 2, correspondiente a aa 146-180 de la proteína FIX madura establecida en SEQ ID NO: 3), una cadena pesada (aa 227-461 de SEQ ID NO: 2, correspondiente a aa 181-415 de la proteína FIX madura establecida en SEQ ID NO: 3) y un dominio de serina proteasa (aa 227-459 de SEQ ID NO: 2, correspondiente a aa 181-413 de la proteína FIX madura establecida en la SEQ ID NO: 3).

Al igual que otras proteínas dependientes de la vitamina K, como la protrombina, los factores de coagulación VII y X y las proteínas C, S y Z, el dominio Gla de FIX es un motivo de unión a la membrana que, en presencia de iones de calcio, interactúa con las membranas fosfolipídicas de las células. Las proteínas dependientes de la vitamina K requieren vitamina K para la síntesis postraduccional del ácido γ-carboxiglutámico, un aminoácido agrupado en el dominio Gla de estas proteínas. El dominio FIX Gla tiene 12 residuos glutámicos, cada uno de los cuales son sitios potenciales de carboxilación. Muchos de ellos, por lo tanto, se modifican por carboxilación para generar residuos de ácido γ-carboxiglutámico. Hay un total de ocho sitios de unión de Ca^{2+}, de alta y baja afinidad, en el dominio FIX Gla que, cuando están ocupados por iones de calcio, facilitan el plegamiento correcto del dominio Gla para exponer residuos hidrófobos en el polipéptido FIX que se insertan en la bicapa lipídica para efectuar la unión a la membrana.

Además del dominio Gla, el polipéptido FIX también contiene dos dominios similares a EGF. Cada dominio similar a EGF contiene seis residuos de cisteína altamente conservados que forman tres enlaces disulfuro en cada dominio en el mismo patrón observado en la proteína EGF. El primer dominio similar a EGF (EGF1) es un dominio de EGF de unión a calcio que contiene un sitio de unión a Ca^{2+} de alta afinidad (Rao et al., (1995) Cell 82: 131-141) que, cuando está ocupado por un ion calcio, contribuye al correcto plegamiento de la molécula y favorece la actividad biológica. El segundo dominio EGF (EGF2) no contiene un sitio de unión a calcio.

El dominio de serina proteasa, o dominio catalítico, de FIX es el dominio responsable de la actividad proteolítica de FIXa. Al igual que otras serina proteasas, FIX contiene una tríada catalítica de serina proteasa compuesta de H221, D269 y S365 (correspondiente a H57, D102 y S195 por numeración de quimotripsina).

La activación de FIX maduro a FIXa se efectúa mediante la división proteolítica de los enlaces R145-A146 y enlaces R180-V181 (numeración relativa al polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3), liberando el péptido de activación que corresponde a aa 146-180 de la proteína FIX madura establecida en SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, después de la activación, FIXa consta de dos cadenas; La cadena ligera y la cadena pesada. La cadena ligera contiene el dominio Gla, los dominios EGF1 y EGF2, y la cadena pesada contiene el dominio proteasa. Las dos cadenas se mantienen unidas por un enlace de disulfuro entre C132 y C289.

2. Modificación postraduccional FIX

El polipéptido precursor del Factor IX sufre una extensa modificación postraduccional para convertirse en el zimógeno maduro que se secreta en la sangre. Dichas modificaciones postraduccionales incluyen γ-carboxilación, β-hidroxilación, división del péptido señal y el propéptido, glucosilación enlazada a O y N, sulfatación y fosforilación. El péptido señal N-terminal dirige el polipéptido al retículo endoplasmático (RE), después de lo cual se divide. Inmediatamente antes de la secreción de la célula, el propéptido se divide procesando proteasas, como, por ejemplo, PACE/furina, que reconocen al menos dos residuos de arginina dentro de cuatro aminoácidos antes del sitio de división.

Una única enzima, la gamma-carboxilasa dependiente de la vitamina K, cataliza el FIX de γ-carboxilación en el ER (Berkner (2000) J. Nutr. 130: 1877-80). En la reacción de carboxilación, la γ-carboxilasa se une al propéptido FIX y cataliza una segunda carboxilación en el carbono γ de los residuos de ácido glutámico (es decir, Glu a γ-carboxiglutamilo o Gla) en el dominio Gla del polipéptido. Suponiendo que todos los residuos de ácido glutámico son γ-carboxilados, FIX contiene 12 residuos Gla, donde los primeros 10 están en posiciones homólogas de otras proteínas dependientes de la vitamina K. El dominio Gla de FIX luego carboxila progresivamente todos los glutamatos en el grupo antes de liberar el sustrato (Morris et al. 1995; Berkner 2000; Stenina et al. 2001).

FIX también está parcialmente β-hidroxilado. Esta modificación es realizada por una dioxigenasa, que hidroxila el carbono β de D64 (correspondiente al polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3) en EGF1. Aproximadamente un tercio de los polipéptidos FIX humanos están β-hidroxilados. Aunque D64 contribuye al sitio de unión de Ca^{2+} de alta afinidad en el dominio EGF1 de FIX, la hidroxilación de este residuo no parece ser necesaria para la unión de Ca^{2+}, ni para la actividad biológica (Derian et al., (1989) J. Biol. Chem 264: 6615-6618, Sunnerhagen et al., (1993) J. Biol. Chem. 268: 23339-23344). Las modificaciones postraduccionales adicionales incluyen la sulfonación en la tirosina en la posición 155 y la fosforilación en el residuo de serina en la posición 158. Estas modificaciones postraduccionales del Factor IX se han implicado en contribuir a la recuperación in vivo de FIX (Kaufman (1998) Thromb. Haemost. 79: 1068-1079, Patente de los Estados Unidos Núm. 7,575,897).

FIX está glicosilado N-enlazado en los residuos de asparagina en el péptido de activación correspondiente a N157 y N167 del polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3. La modificación postraduccional también da como resultado que el residuo de serina en la posición 53 (correspondiente al polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3) tenga disacáridos y trisacáridos unidos a O, mientras que la fracción de serina en la posición 61 contiene un tetrasacárido enlazado a O. (Nishimura et al., (1989) J Biol. Chem. 264: 20320-20325, Harris et al., (1993) Biochemistry 32: 6539-6547). Además, los residuos de treonina en las posiciones de aminoácidos 159 y 169 (correspondientes al polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3) están O-glicosilados (Agarwala et al., (1994) Biochemistry 33: 5167-5171). Los residuos de treonina en las posiciones de aminoácidos 172 y 179 también pueden estar O-glicosilados.

3. Activación FIX

El factor IX circula predominantemente como un zimógeno con actividad proteolítica mínima hasta que se activa por división proteolítica. La activación puede ser efectuada por el complejo TF/FVIIa o Factor XIa. La activación por TF/FVIIa es a través de la ruta intrínseca, mientras que la activación por FXIa es a través de la ruta extrínseca, descrita anteriormente. El proceso de activación parece ser secuencial con la división inicial del enlace Arg145-Ala146, seguido de la división del enlace Arg180-Val181 (Schmidt et al. (2003) Trends Cardio. Med. 13: 39-45). La división proteolítica libera el péptido de activación, formando la molécula FIXa de dos cadenas que contiene la cadena ligera (correspondiente a las posiciones de aminoácidos 1-145 de SEQ ID NO: 3) y la cadena pesada (correspondiente a las posiciones de aminoácidos 181-415 de SEQ ID NO: 3) mantenidas juntas mediante un enlace disulfuro entre las dos cisteínas en las posiciones de aminoácidos 132 y 289 (numeración correspondiente al polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3).

Al menos dos exositos en FX parecen estar implicados en la unión a TF en el complejo TF/FVIIa para formar el complejo ternario FIX/TF/FVIIa (Chen et al., (2002) Thromb. Haemost. 88: 74-82). Los estudios sugieren que se requiere el dominio EGF1 de FIX para la activación de FIX por el complejo TF/FVIIa. Por ejemplo, la mutación de G48 (en relación con el polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3) en el dominio EGF1 de FIX reduce su activación por TF/FVIIa (Wu et al., (2000) Thromb. Haemost. 84: 626-634). Además, se ha demostrado que el dominio EGF1 de FIX interactúa con TF en el complejo TF/FVIIa (Zhong et al., (2002) J. Biol. Chem 277: 3622). Sin embargo, en contraste, el dominio EGF1 no parece ser necesario para la activación de FIX por FXIa. El dominio Gla también está involucrado en la unión al complejo TF/FVIIa y, por lo tanto, en la activación. El dominio Gla de FIX interactúa con la misma región en TF que FX, que también se activa mediante el complejo TF/FVIIa (Kirchhofer et al., (2000) Biochem. 39: 7380-7387).

Después de la división y liberación del péptido de activación, se genera un nuevo terminal amino en V181 (correspondiente al polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3; V16 por numeración de quimotripsina). La liberación del péptido de activación facilita un cambio conformacional mediante el cual el grupo amino de V181 se inserta en el sitio activo y forma un puente de sal con el carboxilato de cadena lateral de D364. Tal cambio es necesario para la conversión del estado zimógeno a un estado activo, ya que el cambio convierte la cadena lateral de hidroxilo de S365 en una especie reactiva que puede hidrolizar el sitio de división de su sustrato, FX. El polipéptido FIXa activado permanece en una conformación similar al zimógeno hasta que se inducen cambios conformacionales adicionales, como por ejemplo al unirse con FVIIIa, para generar un polipéptido FIXa con actividad catalítica máxima.

4. Función FIX

FIX juega un papel importante en la ruta de coagulación y una deficiencia o ausencia de actividad FIX conduce a la hemofilia B. Una vez activado de FIX a FIXa, FIXa a su vez funciona para activar las grandes cantidades de FX a FXa que se requieren para la coagulación. Para hacerlo, FIXa primero debe unirse a su cofactor, Factor VIIIa, para formar el complejo FIXa/FVIIIa, también llamado complejo intrínseco de tenasa, en la superficie de fosfolípidos de la plaqueta activada. Tanto el dominio Gla como el dominio EGF2 de FIX son importantes para la unión estable a los fosfolípidos. El complejo FIXa/FVIIIa luego une FX para dividir este factor de coagulación para formar FIXa.

FIXa está prácticamente inactivo en ausencia de su cofactor, FVIIIa, y sustrato fisiológico, FX. Los estudios experimentales indican que esto puede atribuirse principalmente al ciclo 99. Cuando FIXa no está unido por su cofactor, Y177 bloquea el bucle 99 en una conformación inactiva en la que las cadenas laterales de Y99 y K98 (por la numeración de quimotripsina, correspondiente a Y266 y K265 del polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3) impiden la unión del sustrato. La unión de FVIIIa a FIXa desbloquea y libera esta conformación similar al zimógeno, y FX luego puede asociarse con el complejo FIXa/FVIIIa y reorganizar el bucle 99 desbloqueado, posteriormente se une a la hendidura del sitio activo (Sichler et al, (2003) J. Biol. Chem. 278: 4121-4126). La unión de FIXa a los fosfolípidos y la presencia de Ca^{2+} potencia aún más la reacción.

Se han propuesto diversos modelos de la interacción FIXa/FVIIIa (véase, por ejemplo, Autin et al., (2005) J. Thromb. Haemost. 3: 2044-2056, Stoilova-McPhie et al., (2002) Blood 99: 1215-1223, Bajaj et al., (2001) J. Biol. Chem. 276: 16302-16309, Schmidt et al., (2003) Trends Cardiovasc. Med. 13: 39-45). FIXa se une a FVIIIa en una interacción que involucra más de un dominio del polipéptido FIXa. El FVIIIa es un heterodímero compuesto por tres cadenas asociadas no covalentemente: A1, A2 y A3-C1-C2. A3-C1-C2 también se conoce como la cadena ligera. El dominio de proteasa de FIXa parece interactuar con la subunidad A2 de FVIIIa. Los estudios sugieren que la hélice 293 (la hélice 126 por numeración de quimotripsina), hélice 330 (hélice 162 por numeración de quiotripsina) y N346 (N178) por numeración de quimotripsina) de FIXa están involucradas en la interacción con la subunidad A2 de FVIIIa. Los dominios EGF1/EGF2 de FIXa interactúan con la subunidad A3 de FVIIIa. Además, se postula que el dominio Gla de FIXa interactúa con el dominio C2 de FVIIIa. Los iones de calcio y los fosfolípidos también contribuyen a la unión de FIXa y FVIIIa. Por ejemplo, la presencia de fosfolípidos aumenta la unión de FIXa a FVIIIa en aproximadamente 2000 veces (Mathur et al., (1997) J. Biol. Chem. 272:). Después de la unión de FX por el complejo FIXa/FVIIIa, el dominio de proteasa (o dominio catalítico) de FIXa es responsable de la división de FX en R194-1195 para formar FXa.

La actividad de FIXa está regulada por moléculas inhibidoras, como el complejo AT-III/heparina, como se discutió anteriormente, y otros mecanismos de depuración, como la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP). LRP es una glicoproteína de membrana que se expresa en una variedad de tejidos, incluidos el hígado, el cerebro, la placenta y el pulmón. LRP se une a una amplia gama de proteínas y complejos además de FIXa, que incluyen, pero no están limitados a, apolipoproteínas, lipasas, proteinasas, complejos inhibidores de proteinasas y proteínas de matriz. El zimógeno o la forma inactiva de FIX no se unen a LRP. Más bien, tras la activación, se expone un sitio de unión a LRP (Úneles et al., (2000) Bloc 96: 3459-3465). Este sitio de unión se encuentra en un bucle en el dominio de proteasa que abarca los residuos 342 a 346 del poli péptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3 (Rolen et al., (2003) J. Briol. Chema. 278: 9394-9401)

5. FIX como biofarmacéutico

El factor IX participa integralmente en el proceso de coagulación de la sangre, donde, en su forma activada (FIXa), forma un complejo de tenaza con FVIIIa y activa FX a FXa. FXa, junto con fosfolípidos, calcio y FVa, convierte la protrombina en trombina, que a su vez divide el fibrinógeno en monómeros de fibrina, lo que facilita la formación de un coágulo de malla rígido. Muchos estudios han demostrado la capacidad del FIX exógeno para promover la coagulación de la sangre en pacientes con hemofilia. Por ejemplo, los pacientes con hemofilia B, que tienen deficiencia de FIX, pueden tratarse mediante terapia de reemplazo con FIX exógeno. Las primeras terapias de reemplazo utilizaron FIX purificado por plasma, como las terapias comercializadas como MonoNine® Factor IX y Alpha-nine-SD® Factor IX. También se han utilizado terapias complejas de FIX purificadas por plasma, incluyendo Bebulin® VH, un concentrado purificado de FIX con FX y bajas cantidades de FVII; Konyne® 80 (Bayer), un concentrado purificado de FIX, con FII, FX y bajos niveles de FVII; PROPLEX® T (Baxter International), un producto tratado térmicamente preparado a partir de plasma humano normal combinado que contiene FIX con FII, FVII y FX; y Profilnine SD® (AlphaTherapeuticCorporation). Más recientemente, sin embargo, se ha aprobado un Factor IX recombinante humano

(Factor IX de coagulación BeneFIX® (Recombinante), (Wyeth) para su uso en el control y prevención de episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia B, incluido el control y prevención de hemorragias en entornos quirúrgicos. El factor IX de coagulación BeneFIX® (recombinante) tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 20, y es idéntica a la forma alélica Ala148 del factor IX derivado de plasma. Por lo tanto, en comparación con el polipéptido FIX de tipo silvestre establecido en SEQ ID NO: 3, BeneFIX®, Factor de coagulación IX (recombinante) contiene una mutación T148A.

Además de su uso como procoagulante, las formas inactivas de FIX, o formas con actividad catalítica reducida, se pueden usar como anticoagulantes, como en el tratamiento de enfermedades y afecciones trombóticas.

Típicamente, FIX se administra por vía intravenosa, pero también se puede administrar por vía oral, sistémica, bucal, transdérmica, intramuscular y subcutánea. FIX puede administrarse una o varias veces. En general, se usan múltiples administraciones en regímenes de tratamiento con FIX para efectuar la coagulación.

Como se discute en el presente documento a continuación, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento también se pueden usar en cualquier tratamiento o método farmacéutico en el que se sabe que se usa un polipéptido FIX no modificado o de tipo silvestre u otro polipéptido terapéuticamente activo. En tales usos, métodos y procesos, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento exhiben propiedades mejoradas en comparación con un tipo silvestre o el polipéptido FIX no modificado.

D. Polipéptidos FIX modificados

En este documento se proporcionan polipéptidos de factor IX modificado de acuerdo con las reivindicaciones. Los polipéptidos FIX se pueden modificar mediante deleciones, inserciones o reemplazo (sustitución) de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia primaria de un polipéptido FIX de tipo silvestre o no modificado. Los polipéptidos modificados resultantes exhiben propiedades o actividades mejoradas en comparación con el polipéptido FIX no modificado o de tipo silvestre. Por ejemplo, los polipéptidos de factor IX modificado, incluidos los polipéptidos FIXa modificados y los fragmentos de polipéptidos de factor IX y factor IXa modificados, pueden tener una modificación postraduccional alterada, como la glucosilación alterada, incluida la hiperglucosilación, y/o la fosforilación o sulfatación alterada, como la fosforilación o sulfatación disminuidas; mayor resistencia a los inhibidores, como AT-III y/o heparina; disminución de la unión a LRP; aumento de la actividad catalítica; propiedades farmacocinéticas mejoradas, que incluyen una depuración disminuida y una vida media en suero aumentada in vivo; aumento de la actividad coagulante; o cualquier combinación de los mismos. Típicamente, los polipéptidos FIX modificados exhiben actividad procoagulante. Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados que exhiben una actividad coagulante incrementada tras la activación desde su forma de zimógeno de cadena sencilla y posterior unión al cofactor, FVIIIa. Dichos polipéptidos FIX modificados se pueden administrar a pacientes con enfermedades o afecciones caracterizadas por una coagulación insuficiente, como, por ejemplo, hemofilia B.

En algunos ejemplos, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento presentan una resistencia incrementada a los inhibidores, que incluyen AT-III, heparina y el complejo AT-III/heparina, en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Tales polipéptidos FIX modificados pueden exhibir una actividad coagulante incrementada en comparación con un polipéptido FIX no modificado. En otros ejemplos, los polipéptidos de factor IX modificado proporcionados en la presente memoria exhiben modificación postraduccional alterada, tal como niveles alterados de glucosilación y/o tipos alterados de glucosilación en comparación con un polipéptido FIX no modificado.

En algunos ejemplos, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento exhiben una glucosilación aumentada en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Por lo tanto, en este documento se proporcionan polipéptidos FIX hiperglicosilados. Los polipéptidos FIX modificados pueden exhibir un aumento de la glucosilación en virtud de la incorporación de al menos un sitio de glucosilación no nativo (es decir, un sitio de glucosilación que no se encuentra en el polipéptido FIX no modificado o de tipo silvestre) al que está unido a una fracción de carbohidrato. Dichos polipéptidos FIX modificados pueden exhibir propiedades farmacocinéticas mejoradas in vivo, incluyendo una depuración disminuida y una vida media en suero incrementada. La introducción de un sitio de glucosilación no nativo y una fracción de carbohidrato posterior puede mejorar aún más la actividad del polipéptido FIX modificado al dificultar estéricamente la interacción del polipéptido FIX con una o más proteínas adicionales. Por ejemplo, se puede introducir un sitio de glucosilación de modo que cuando se une una fracción de carbohidrato en este sitio, éste estéricamente impide la interacción del polipéptido FIX modificado con el complejo AT-III/heparina, dando como resultado un polipéptido con mayor resistencia a AT- III/heparina. Esto puede reducir aún más la depuración del polipéptido de la circulación. Por lo tanto, los efectos de la introducción de un nuevo sitio de glucosilación pueden ser varias veces si la fracción de carbohidratos también obstaculiza estéricamente una interacción con otra(s) proteína(s), como el complejo AT-III/heparina.

Por ejemplo, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento pueden contener una o más modificaciones que introducen uno o más sitios de glucosilación no nativos en comparación con el polipéptido FIX no modificado. Por ejemplo, se pueden introducir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más sitios de glucosilación no nativos. Los sitios de glucosilación que se pueden introducir incluyen, pero no se limitan a, sitios de N-glucosilación, sitios de O-glucosilación, o una combinación de los mismos. Por lo tanto, cuando se produce en una célula que facilita la glucosilación, o después

de la glucosilación in vitro, los polipéptidos FIX modificados que se proporcionan en este documento pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más fracciones de carbohidratos, cada uno de ellos vinculado a diferentes sitios de glucosilación no nativos, además de las fracciones de carbohidratos unidos a los sitios de glucosilación nativos (por ejemplo, los sitios de glucosilación nativos correspondientes a S53, S61, N157, N167, T159, T169, T172 y T179 del polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3). En un ejemplo particular, los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí contienen uno o más sitios de N-glucosilación no nativos. Por lo tanto, los polipéptidos FIX modificados pueden exhibir niveles aumentados de N-glucosilación en comparación con un polipéptido FIX no modificado.

Los polipéptidos FIX modificados con glucosilación incrementada también pueden exhibir, por ejemplo, solubilidad incrementada, resistencia incrementada a AT-III/heparina, vida media en suero incrementada, inmunogenicidad disminuida y/o actividad coagulante incrementada en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Tales polipéptidos FIX modificados pueden usarse en el tratamiento de trastornos o eventos hemorrágicos, tales como hemofilias o lesiones, donde los polipéptidos FIX pueden funcionar para promover la coagulación de la sangre. En algunos casos, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento que exhiben una glucosilación aumentada también pueden contener una o más modificaciones que hacen la proteína inactiva, o en mayormente inactiva. Tales polipéptidos, por lo tanto, pueden exhibir una mayor actividad anticoagulante y pueden usarse en el tratamiento de eventos, afecciones o enfermedades trombóticas. Típicamente, sin embargo, los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí son procoagulantes.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí también pueden exhibir otras actividades y/o propiedades. Por ejemplo, algunos de los polipéptidos FIX modificados contienen una o más modificaciones que aumentan la actividad catalítica. En otros ejemplos, los polipéptidos FIX modificados contienen una o más modificaciones que disminuyen la fosforilación, la sulfatación, la hidroxilación y/o la glucosilación. En otros ejemplos, los polipéptidos FIX modificados contienen modificaciones que interfieren con la interacción entre FIX y LRP. Al interrumpir la unión de FIX a LRP, se puede disminuir la depuración de FIX de la circulación. Por lo tanto, las modificaciones que reducen la unión de FIX a LRP pueden mejorar las propiedades farmacocinéticas de FIX in vivo.

Las modificaciones, tales como los reemplazos de aminoácidos, descritos en este documento, tales como las modificaciones que introducen uno o más sitios de glucosilación no nativos o aumentan la resistencia a los inhibidores, pueden realizarse en cualquier polipéptido FIX (por ejemplo, polipéptido FIX no modificado o de tipo silvestre), que incluye un polipéptido precursor FIX con una secuencia establecida en SEQ ID NO: 2, un polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3, o en un polipéptido FIX que tiene una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con el conjunto de polipéptidos FIX establecido en SEQ ID NOS: 2 o SEQ ID NO: 3. Se entiende que la referencia en el presente documento a residuos de aminoácidos es con respecto a la numeración del polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3. Está dentro del nivel de un experto en la técnica identificar un residuo de aminoácido correspondiente en otro polipéptido FIX de cualquier forma, tal como un precursor, forma madura u otra forma activa, mediante la alineación de la secuencia del otro polipéptido FIX con SEQ ID NO: 3 (véase, por ejemplo, la Figura 3). Cualquier reemplazo de aminoácidos proporcionado en este documento puede realizarse en un residuo de aminoácido correspondiente que difiere o no es el mismo que el residuo de aminoácido de reemplazo. Está dentro del nivel de un experto en la técnica probar cualquier polipéptido FIX modificado resultante para actividad o propiedad como se describe en este documento.

Por ejemplo, las modificaciones, tales como un reemplazo de aminoácidos, se pueden realizar en cualquier especie, alélica o variante modificada, como las descritas en la técnica. Las variantes alélicas de FIX incluyen, entre otras, T148A y T412P. Cualquiera de los reemplazos de aminoácidos proporcionados en este documento puede ser un Factor IX que contiene mutaciones T148A o T412P. Por ejemplo, las modificaciones, tales como cualquier reemplazo de aminoácidos, se pueden realizar en un polipéptido FIX establecido en SEQ ID NO: 325 o SEQ ID NO: 20. Las variantes de especies ejemplares para modificación en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos humanos y no humanos que incluyen polipéptidos FIX de chimpancé, rhesus macaco, ratón, rata, conejillo de indias, cerdo, perro, gato, conejo, pollo, vaca, oveja, rana, pez cebra, y polipéptodos FIX de pez globo japonés, cuyas secuencias se establecen en SEQ ID NOS: 4-18, respectivamente. Las modificaciones en un polipéptido FIX se pueden hacer a un polipéptido FIX que también contiene otras modificaciones, como las descritas en la técnica, incluidas modificaciones de la secuencia primaria y modificaciones que no están en la secuencia primaria del polipéptido (véase, por ejemplo, la Sección D.6, que describe ejemplos de polipéptidos FIX modificados a los que se pueden hacer las modificaciones amino descritas en el presente documento).

En otros ejemplos, las modificaciones, tales como un reemplazo de aminoácidos, pueden realizarse en cualquier fragmento activo de un polipéptido FIX, tal como un fragmento activo de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, o un fragmento activo de una especie, variante alélica o modificada, como las descritas en la técnica, el fragmento activo contiene una secuencia contigua de aminoácidos que contienen el dominio catalíticamente activo del polipéptido o una porción catalíticamente activa del mismo que contiene las modificaciones de aminoácidos, como reemplazos de aminoácidos descritos en este documento. El fragmento activo exhibe al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad de la forma madura del polipéptido, tal como el polipéptido FIX establecido en SEQ ID NO: 3.

La modificación de polipéptidos FIX también incluye la modificación de polipéptidos que son híbridos de diferentes polipéptidos FIX y también polipéptidos FIX sintéticos preparados de forma recombinante o sintetizados o construidos por otros métodos conocidos en la técnica basados en la secuencia de polipéptidos conocidos. Por ejemplo, en base a la alineación de FIX con otros miembros de la familia de factores de coagulación, incluidos, pero no están limitados a, el factor FVII (FVII) y el factor X (FX), los dominios homólogos entre los miembros de la familia se identifican fácilmente. Las variantes quiméricas de los polipéptidos FIX pueden construirse donde uno o más aminoácidos o dominios completos se reemplazan en la secuencia de aminoácidos FIX usando la secuencia de aminoácidos del miembro de la familia correspondiente. Además, los polipéptidos FIX quiméricos incluyen aquellos en los que uno o más aminoácidos o dominios completos se reemplazan en la secuencia de aminoácidos FIX humana usando la secuencia de aminoácidos de una especie diferente. Dichas proteínas quiméricas se pueden usar como el polipéptido FIX inicial no modificado en el presente documento.

Las modificaciones proporcionadas en el presente documento de un polipéptido de referencia inicial no modificado incluyen reemplazos o sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones de aminoácidos, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, los polipéptidos FIX modificados incluyen aquellos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 posiciones modificadas. En algunos ejemplos, una modificación que se realiza para alterar una actividad o propiedad de FIX también puede, o en cambio, afectar una o más de otras actividades o propiedades. En otro ejemplo, una modificación hecha para introducir un nuevo sitio de glucosilación también puede resultar en una resistencia a los inhibidores y/o aumentar la actividad catalítica. En otro ejemplo, una modificación realizada para disminuir la unión a LRP también puede, o en cambio, aumentar la resistencia a un inhibidor, como AT-III/heparina. Por lo tanto, aunque las modificaciones descritas en el presente documento generalmente se describen en relación con su efecto previsto en las actividades o propiedades de FIX, se entiende que cualquiera de las modificaciones descritas en el presente, solo o junto con una o más modificaciones, puede dar lugar a cambios en otras, actividades o propiedades no predichas.

Cualquier modificación proporcionada en este documento puede combinarse con cualquier otra modificación conocida por un experto en la materia. Típicamente, el polipéptido FIX modificado resultante muestra una mayor actividad de coagulación cuando está en su forma de dos cadenas. Las actividades o propiedades que pueden alterarse como resultado de la modificación incluyen, pero no se limitan a, coagulación o actividad coagulante; actividad procoagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como efectuar la activación del factor X (FX); antigenicidad (capacidad de unirse o competir con un polipéptido para unirse a un anticuerpo antiFIX); capacidad de unirse a FVIIIa, antitrombina III, heparina y/o factor X; capacidad de unirse a fosfolípidos; estructura tridimensional; pI; y/o conformación. Se incluyen entre los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento aquellos que tienen una mayor resistencia a la antitrombina III (AT-III), una mayor resistencia a la heparina, una glucosilación alterada, tal como una mayor glucosilación, una mayor actividad catalítica y mejores propiedades farmacocinéticas, como i) depuración disminuida, ii) volumen alterado de distribución, iii) recuperación in vivo mejorada, iv) exposición a proteínas totales mejorada in vivo (es decir, AUC), v) semivida sérica aumentada (fase α-, β- y/o γ), y/o vi) aumento del tiempo medio de resonancia (MRT).

En algunos ejemplos, una modificación puede afectar dos o más propiedades o actividades de un polipéptido FIX. Por ejemplo, una modificación puede dar como resultado una mayor resistencia a AT-III y una mayor actividad catalítica del polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado. En otro ejemplo, una modificación que introduce un sitio de N-glucosilación no nativo y, por lo tanto, puede aumentar los niveles de glucosilación del polipéptido cuando se expresa en una célula apropiada, tal como una célula de mamífero, también puede dar como resultado una mayor actividad catalítica del polipéptido FIX modificado en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden ensayarse para cada propiedad y actividad para identificar el rango de efectos de una modificación. Tales ensayos son conocidos en la técnica y se describen a continuación. Típicamente, los cambios en las propiedades y/o actividades de los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento se realizan mientras se retienen otras actividades o propiedades FIX, tales como, pero sin limitarse a, unión a FVIIIa y/o unión y activación de FX. Por lo tanto, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en la presente memoria retienen la unión FVIIIa y/o la unión FX y la activación en comparación con un tipo silvestre o forma de partida del polipéptido FIX. Típicamente, dicha actividad no cambia sustancialmente (menos del 1%, 5% o 10% cambia) en comparación con una proteína de tipo silvestre o de partida. En otros ejemplos, la actividad de un polipéptido FIX modificado aumenta o disminuye en comparación con un polipéptido FIX de tipo silvestre o de partida. La actividad se puede evaluar in vitro o in vivo y se puede comparar con el polipéptido FIX no modificado, como, por ejemplo, el polipéptido FIX nativo de tipo silvestre maduro (SEQ ID NO: 3), el polipéptido FIX precursor de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2), o cualquier otro polipéptido FIX conocido por un experto en la técnica que se usa como material de partida.

Las modificaciones proporcionadas en el presente documento pueden realizarse mediante técnicas de ADN recombinante estándar, tales como las rutinarias para un experto en la materia. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para efectuar la mutación de uno o más aminoácidos en una proteína diana. Los métodos incluyen mutagénesis dirigida al sitio estándar de moléculas de ácido nucleico codificantes, o mediante métodos de síntesis de polipéptidos en fase sólida.

Otras modificaciones que están o no en la secuencia primaria del polipéptido también pueden incluirse en un polipéptido FIX modificado, o conjugado del mismo, que incluye, pero no se limita a, la adición de una fracción de carbohidrato, la

adición de una fracción de polietilenglicol (PEG), la adición de un dominio Fc, una albúmina sérica y/u otra proteína. Por ejemplo, tales modificaciones adicionales se pueden hacer para aumentar la estabilidad o la vida media de la proteína.

Los polipéptidos FIX modificados resultantes incluyen aquellos que son polipéptidos de zimógeno de cadena sencilla y aquellos que son polipéptidos de tipo zimógeno de dos cadenas (es decir, polipéptidos FIXa que no están unidos al cofactor, FVIIIa). Cualquier polipéptido FIX modificado proporcionado en este documento que sea un polipéptido de cadena sencilla puede activarse para generar un FIXa modificado (es decir, una forma de dos cadenas). Las actividades de un polipéptido FIX modificado se exhiben típicamente en su forma de dos cadenas.

1. Reemplazos ejemplares de aminoácidos

En este documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados de acuerdo con las reivindicaciones que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos como se describe a continuación en este documento con la numeración de residuos con respecto a la numeración de la SEQ ID NO: 3. Se pueden hacer los mismos reemplazos de aminoácidos en los residuos de aminoácidos correspondientes en otro polipéptido FIX (véase, por ejemplo, la Figura 3 para ejemplificar la identificación de los residuos de aminoácidos correspondientes). Los reemplazos de aminoácidos confieren glucosilación alterada (por ejemplo, mediante la introducción de sitios de glucosilación no nativos o la eliminación de sitios de glucosilación nativos), mayor resistencia a AT-III y/o heparina, mayor actividad catalítica, disminución de la unión de LRP y/o alteración de modificaciones postraduccionales. Los polipéptidos FIX modificados resultantes exhiben una eficacia terapéutica mejorada, por ejemplo, debido a una actividad farmacodinámica o farmacocinética mejorada.

En particular, ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos en polipéptidos FIX modificados proporcionados a continuación en el presente documento están en uno cualquiera o más residuos de aminoácidos 155, 318, 338, 343, 403 y/o 410 con numeración con respecto al polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3 (correspondiente a los residuos de aminoácidos [155], 150, 170, 175, 233 y/o 240, respectivamente, por numeración de quimotripsina) siempre que se seleccione un reemplazo de aminoácidos entre R318Y, R318E, R318F y R318W. Los residuos correspondientes a cualquiera de 155, 318, 338, 343, 403 y/o 410 en otros polipéptidos FIX se pueden determinar por alineación de secuencia con SEQ ID NO: 3 (véase, por ejemplo, la Figura 3). Se entiende que los reemplazos de aminoácidos proporcionados aquí en cualquiera de los residuos de aminoácidos 155, 318, 338, 343, 403 y/o 410 con numeración con respecto a la SEQ ID NO: 3 se pueden hacer en otros polipéptidos FIX como se describe en otro lugar aquí. También se entiende que los residuos correspondientes a cualquiera de los otros reemplazos de aminoácidos proporcionados en el presente documento también pueden identificarse en otros polipéptidos FIX como se ejemplifica en el presente (por ejemplo, la Figura 3).

En particular, se proporcionan en el presente documento reemplazos de aminoácidos Y155F, Y155L, R318Y, R318E, R318F, R318W, R338E, T343R, T343E, T343D, R403E, E410S, E410N, o un reemplazo conservador de aminoácidos (véase, por ejemplo, la Tabla 2B). En algunos ejemplos, el reemplazo de aminoácidos es Y155F, R318Y, R318E, R338E, T343R, R403E y/o E410N o reemplazos de aminoácidos conservadores de los mismos.

Por ejemplo, como se muestra por los datos en el presente documento, el reemplazo de aminoácidos en la posición R318 con referencia a la SEQ ID NO: 3 (150 por numeración de quimotripsina) confiere resistencia a la inhibición por el complejo AT-III/heparina. Un reemplazo de aminoácidos en la posición R338 (R170 por numeración de quimotripsina) también confiere resistencia a la inhibición por el complejo AT-III/heparina. A este respecto, la posición de aminoácidos R338 es el sitio de una mutación natural (R170L) que se ha reportado que exhibe una actividad de coagulación mejorada de 5 a 10 veces en un ensayo de coagulación in vitro (Publicación de Patente Internacional No. WO 2010029178). El ensayo descrito se realizó con medios acondicionados en lugar de proteína purificada y la concentración de proteína se midió usando un ensayo ELISA. En consecuencia, estos datos podrían reflejar una mayor fracción de material activo en la preparación R338L (R170L) en comparación con la preparación del comparador de tipo silvestre o un mayor nivel de contaminantes que están activos en un ensayo de coagulación. Sin embargo, como se muestra en el presente documento, hay una eficiencia aumentada de 3.5 a 4 veces para la activación de FX por variantes que contienen A, E y L en la posición 338 (170). Como se encuentra en el presente documento, la mutación R338E, además, exhibió una resistencia de aproximadamente 88 veces a la inhibición por el complejo heparina/AT-III, así como una unión mejorada en 2 veces al cofactor, FVIIIa.

Se ha reportado que una mutación de intercambio de bucle de trombina de 4 aminoácidos en FIX, desde las posiciones 342-345 (174-177 por numeración de quimotripsina) reduce la unión de FIXa a sLRP (ver, Rohlena et al., (2003) J. Biol. Chem. 9394-9401). La mutación del residuo en la posición T343 (T175 por numeración de quimotripsina) no confirió ningún efecto significativo sobre las propiedades farmacocinéticas (PK) de FIX. Se encuentra aquí que la mutación T343R (T175R por numeración de quimotripsina), sin embargo, aumenta la eficacia catalítica para la activación de FX por un factor de aproximadamente 3.1, produce una resistencia de aproximadamente 5.6 veces al complejo heparina/AT-III, y aumenta la afinidad por el FVIIIa por un factor de aproximadamente 1.6 veces.

También como se muestra en el presente documento, las mutaciones en la posición R403 (R233 por numeración de quimotripsina) confieren resistencia a la inhibición por el complejo heparina/AT-III. Las mutaciones en la posición E410

(E240 por numeración de quimotripsina), como E410N, producen un aumento significativo, hasta ahora no observado, de 1.3 a 2.8 veces en la eficacia catalítica para la activación de FX.

Además, como se muestra allí, existe una sinergia en las mutaciones en R338 y T343 (R170 y T175 por numeración de quimotripsina), particularmente R338E y T343R en la unión mejorada al cofactor FVIII. También se observó sinergia entre mutaciones en las posiciones R338 y E410 (R170 y E240 por numeración de quimotripsina), particularmente R338E y E410N. Los dos mutantes dobles, ejemplificados en este documento, R338E/T343R y R338E/E410N exhiben una unión mejorada de 24 a 28 veces al FVIIIa, mientras que cada una de las mutaciones individuales solo mejoran la unión en 1.6-2.2 veces cada una.

Otros reemplazos de aminoácidos ejemplares en un polipéptido FIX provisto en el presente documento que confieren una propiedad o actividad alterada como se describe a continuación pueden estar en cualquier residuo de aminoácido entre 1, 5, 53, 61, 64, 85, 103, 104, 105, 106, 108, 148, 157, 158, 159, 167, 169, 172, 179, 202, 203, 204, 205, 228, 239, 241, 243, 247, 249, 251, 257, 259, 260, 262, 284, 293, 312, 314, 315, 316, 317, 319, 320, 321, 333, 342, 345, 346, 392, 394, 400, 412 o 413 con referencia a la SEQ ID NO: 3 o en un residuo de aminoácido correspondiente. Por ejemplo, los reemplazos de aminoácidos ejemplares en un polipéptido FIX proporcionado en este documento también incluyen, pero no se limitan a, YIN, K5A, S53A, S61A, S61C, S61D, S61E, S61F, S61G, S61I, S61K, S61L, S61P, S61R, S61V, S61W, S61Y, D64A, D64C, D64F, D64H, D64I, D64L, D64M, D64N, D64P, D64R, D64S, D64T, D64W, D85N, A103N, D104N, N105S, N105T, K106N, K106S, K106T, V108S, V108T, T148A, N157D, N157E, N157F, N1571, N157K, N157L, N157M, N157Q, N157R, N157V, N157W, N157Y, S158A, S158D, S158E, S158F, S158G, S158I, S158K, S158L, S158M, S158R, S158V, S158W, S158Y, T159A, N167D, N167Q, N167E, N167F, N167G, N167H, N167I, N167K, N167L, N167M, N167P, N167R, N167V, N167W, N167Y, T169A, T169D, T169E, T169F, T169G, T169I, T169K, T169L, T169M, T169P, T169R, T169S, T169V, T169W, T169Y, T172A, T172D, T172E, T172F, T172G, T172I, T172K, T172L, T172M, T172P, T172R, T172S, T172V, T172W, T172Y, T179A, V202M, V202Y, D203N, D203M, D203Y, D203F, D203H, D203I, D203K, D203L, D203R, D203V, D203W, A204M, A204Y, A204F, A204I, A204W, F205S, F205T, K228N, E239A, E239S, E239R, E239K, E239D, E239F, E239I, E239L, E239M, E239N, E239T, E239V, E239W, E239Y, T241N, H243S, H243T, K247N, N249S, N249T, I251S, H257F, H257E, H257D, H257I, H257K, H257L, H257M, H257Q, H257R,H257S, H257V, H257W, H257Y, N260S, A262S, A262T, Y284N, K293E, K293A, R312A, R312Y, R312L, R312C, R312D, R312E, R312F, R312I, R312K, R312L, R312M, R312P, R312Q, R312S, R312T, R312V, R312W, R312Y, F314N, H315S, K316M, K316D, K316F, K316H, K316I, K316L,K316M, K316R, K316S, K316T, K316V, K316W, K316Y, G317N, S319N, A320S, L321N, L321S, L321T, R333A, R333E, F342I, F342D, F342E, F342K, F342L, F342M, F342S, F342T, F342V, F342W, F342Y, Y345A, Y345T, N346D, N346Y, N346E, N346F, N346H, N346I, N346K, N346L, N346M, N346Q, N346R, N346T, N346V, N346W, K392N, K394S, K394T, K400A, K400E, K400C, K400D, K400F, K400G, K400L, K400M, K400P, K400S, K400T, K400V, K400Y, T412A, T412V, T412C, T412D, T412E, T412F, T412G, T412I, T412M, T412P, T412W, T412Y, K413N en un polipéptido FIX maduro que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO: 3 o el mismo reemplazo en una posición de residuo de aminoácido correspondiente.

Por ejemplo, las propiedades y actividades ejemplares que se alteran por las modificaciones (por ejemplo, reemplazos de aminoácidos) proporcionadas en el presente documento se describen a continuación.

a. Glucosilación alterada

Los polipéptidos de factor IX modificado proporcionados aquí pueden exhibir niveles de glucosilación alterados y/o tipos de glucosilación alterados en comparación con un polipéptido FIX no modificado. En algunos ejemplos, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento exhiben una glucosilación aumentada en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Por lo tanto, entre los polipéptidos FIX modificados descritos en el presente documento se encuentran los polipéptidos FIX hiperglucosilados.

i. Ventajas de la glucosilación

Muchas proteínas de mamíferos están glucosiladas con un número variable de cadenas de carbohidratos, cada una de las cuales puede tener diferentes estructuras de carbohidratos. Tales carbohidratos pueden tener un papel importante en la estabilidad, solubilidad, actividad, vida media en suero e inmunogenicidad de la proteína. Por lo tanto, las propiedades y actividades de una proteína pueden alterarse modulando la cantidad y/o tipo de glucosilación. Por ejemplo, la glucosilación puede aumentar la vida media en suero de los polipéptidos al aumentar la estabilidad, la solubilidad, y reducir la inmunogenicidad de una proteína. Esto es de particular interés para los polipéptidos terapéuticos, donde el aumento de la solubilidad, la vida media en suero y la estabilidad del polipéptido terapéutico pueden dar como resultado una mayor eficacia terapéutica.

Los oligosacáridos son importantes en eventos intra e intercelulares tales como un reconocimiento, señalización y adhesión. Los carbohidratos también ayudan al plegamiento de las proteínas secretadas. Los sitios de glucosilación proporcionan un sitio para la unión de monosacáridos y oligosacáridos a un polipéptido a través de un enlace glucosídico, de modo que cuando el polipéptido se produce, por ejemplo, en una célula eucariota capaz de glucosilación, se glucosila. Existen diversos tipos de glucosilación de proteínas. La glucosilación enlazada a N y enlazada a O son las clases principales, en las que se modifica un residuo de asparagina, o un residuo de serina o treonina, respectivamente. Otros tipos de glucanos incluyen, glicosaminoglucanos y anclas de glicosilofofatidilinositol

(GPI). Los glicosaminoglucanos se unen al hidroxi oxígeno de la serina, mientras que los anclajes GPI unen una proteína a un ancla lipídica hidrófoba, a través de una cadena de glucano. La glucosilación en C también puede ocurrir en la secuencia consenso Trp-X-X-Trp, donde la cadena lateral de indol del primer residuo de triptófano en las secuencias se modifica con un grupo α-manopiranosilo (Furmanek et al., (2000) Acta Biochim. Pol 47: 781-789).

La presencia de un sitio potencial de glucosilación no asegura, sin embargo, que el sitio será glicosilado durante el procesamiento postraduccional en el ER. Además, el nivel de glucosilación puede variar en cualquier sitio dado, al igual que las estructuras de glucano. Las diferencias en los niveles y tipos de glucosilación en sitios particulares pueden atribuirse, al menos en parte, al contexto de secuencia y la estructura secundaria alrededor del sitio potencial de glucosilación.

La glucosilación enlazada a O implica la unión de las unidades de azúcar, tales como N-acetilgalactosamina, a través del grupo hidroxilo de los residuos de serina, treonina, hidroxilisina o hidroxiprolina. Se inicia mediante la unión de un monosacárido, después de lo cual se agregan otros para formar una estructura madura de O-glucano. No hay un motivo conocido para la O-glucosilación, aunque la O-glucosilación es más probable en secuencias con una alta proporción de residuos de serina, treonina y prolina. Además, los elementos estructurales secundarios, como un giro β extendido, también pueden promover la O-glucosilación. La O-glucosilación carece de una estructura central común. En cambio, se pueden unir varios tipos de glucanos en los sitios de O-glucosilación seleccionados, incluyendo O-N-acetilgalactosamina (O-GalNAc), O-N-acetilglucosamina (O-GlcNAc), O-fucosa y O-glucosa.

En contraste con la O-glucosilación, el motivo de secuencia consenso de glucosilación enlazada a N está bien caracterizado. Durante la glucosilación enlazada a N, un oligosacárido de 14 residuos se transfiere al residuo de asparagina en el motivo de consenso Asn-X-Ser/Thr/Cys, donde X es cualquier aminoácido excepto Pro. Las glucosiltransferasas luego recortan enzimáticamente el sacárido y unen unidades de azúcar adicionales a los residuos de manosa. La secuencia adyacente al motivo de consenso también puede afectar si la glucosilación se produce o no en la secuencia de consenso. Por lo tanto, la presencia de la secuencia de consenso Asn-X-Ser/Thr/Cys se requiere, pero no necesariamente suficiente para que ocurra la glucosilación enlazada a N. En algunos casos, los cambios en la secuencia adyacente dan como resultado la glucosilación en el motivo de consenso donde previamente no había ninguno (Elliot et al., (2004) J. Biol. Chem. 279: 16854-16862).

Los oligosacáridos enlazados a N comparten una estructura central común de $GlcNAc_2Man_3$. Existen tres tipos principales de sacáridos enlazados a N en mamíferos: oligosacáridos con alto contenido de manosa, oligosacáridos complejos y oligosacáridos híbridos. Los oligosacáridos con alto contenido en manosa contienen esencialmente dos N-acetilglucosaminas con diversos residuos de manosa. En algunos casos, el oligosacárido final de alto contenido en manosa unido a N contiene tantos residuos de manosa como el oligosacárido precursor antes de unirse a la proteína. Los oligosacáridos complejos pueden contener casi cualquier número de manosa, N-acetilglucosaminas y sacáridos de fucosa, incluidas más de las dos N-acetilglucosaminas en la estructura central.

La glucosilación puede aumentar la estabilidad de las proteínas al reducir la proteólisis de la proteína y puede proteger la proteína de la degradación térmica, la exposición a agentes desnaturalizantes, el daño por radicales libres de oxígeno y los cambios en el pH. La glucosilación también puede permitir que la proteína objetivo evada los mecanismos de depuración que pueden implicar la unión a otras proteínas, incluidos los receptores de la superficie celular. El componente de ácido siálico de los carbohidratos en particular puede mejorar la vida media en suero de las proteínas. Las fracciones de ácido siálico son altamente hidrófilos y pueden proteger los residuos hidrófobos de la proteína objetivo. Esto aumenta la solubilidad y disminuye la agregación y precipitación de la proteína. La agregación disminuida reduce la probabilidad de que una respuesta inmune se eleve a la proteína. Además, los carbohidratos pueden proteger las secuencias inmunogénicas del sistema inmune, y el volumen de espacio ocupado por las fracciones de carbohidratos puede disminuir el área de superficie disponible que es inspeccionada por el sistema inmune. Estas propiedades pueden conducir a la reducción de la inmunogenicidad de la proteína diana.

La modificación del nivel y/o tipo de glucosilación de un polipéptido terapéutico puede afectar la actividad in vivo del polipéptido. Al aumentar el nivel de glucosilación, los polipéptidos recombinantes pueden hacerse más estables con una vida media en suero aumentada, una depuración en suero reducido y una inmunogenicidad reducida. Esto puede aumentar la actividad in vivo del polipéptido, dando como resultado dosis reducidas y/o frecuencia de dosificación para lograr un efecto terapéutico comparable. Por ejemplo, una forma hiperglucosilada de eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO), llamada Darbepoetin alfa (DA), ha aumentado la actividad in vivo y la duración prolongada de la acción. El mayor contenido de carbohidratos y ácido siálico del polipéptido DA hiperglucosilado da como resultado una vida media en suero que es tres veces mayor que la del rHuEPO no modificado. Este aumento de la vida media en suero da como resultado una mayor biodisponibilidad y una depuración reducida, lo que puede permitir una dosificación menos frecuente y/o dosis más bajas, con una mayor conveniencia asociada para el paciente, un menor riesgo de efectos adversos y una mejor conformidad del paciente.

ii. Ejemplos de polipéptidos FIX modificados con glucosilación alterada

En el presente documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados que se modifican para exhibir glucosilación alterada en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Los polipéptidos FIX modificados pueden exhibir

glucosilación aumentada o disminuida, tal como mediante la incorporación de sitios de glucosilación no nativos o la deleción de sitios de glucosilación nativos, respectivamente. Por ejemplo, los polipéptidos FIX modificados pueden contener 1, 2, 3, 4 o más sitios de N-glucosilación no nativos. Los sitios de N-glucosilación no nativos se pueden introducir mediante reemplazo(s) de aminoácidos (o sustitución(es)), inserción(es) o deleción(es), o cualquier combinación de los mismos, en los que el(los) reemplazo(s) de aminoácido, las inserciones y/o deleciones dan como resultado el establecimiento del motivo de glucosilación Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, donde Xaa no es prolina. En otros ejemplos, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden tener un número reducido de sitios de glucosilación en comparación con un polipéptido FIX no modificado, lo que típicamente da como resultado un nivel reducido de glucosilación en comparación con el polipéptido FIX no modificado. En otros ejemplos, los polipéptidos FIX modificados exhiben los mismos niveles de glucosilación que FIX de tipo silvestre, pero exhiben diferentes tipos de glucosilación. Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado puede exhibir el mismo número de sitios de glucosilación y el mismo nivel de glucosilación que un polipéptido FIX no modificado, pero puede tener diferentes tipos de glucosilación, como, por ejemplo, diferentes cantidades relativas de N- y O-glucosilación en comparación con un polipéptido FIX no modificado.

(a). Introducción de sitio(s) de glucosilación no nativos

En ejemplos particulares, se introduce un sitio de N-glucosilación no nativo por sustitución de aminoácidos. En algunos casos, la creación de un sitio de N-glucosilación no nativo por reemplazo de aminoácidos requiere solo un reemplazo de aminoácidos. Por ejemplo, si el polipéptido FIX no modificado contiene una secuencia de Gly-Ala-Ser, entonces se puede crear un sitio de N-glucosilación mediante una única sustitución de aminoácidos de la glicina con una asparagina, para crear un motivo de N-glucosilación de Asn-Ala-Ser. En otro ejemplo, si el polipéptido FIX no modificado contiene una secuencia de Asn-Trp-Met, entonces se puede crear un sitio de N-glucosilación mediante una única sustitución de aminoácidos de la metionina con una cisteína (o treonina o serina). En otros casos, la creación de un sitio de N-glucosilación no nativo por reemplazo de aminoácidos requiere más de un reemplazo de aminoácidos. Por ejemplo, si el polipéptido FIX no modificado contiene una secuencia Gly-Arg-Phe, entonces se puede crear un sitio de N-glucosilación mediante dos reemplazos de aminoácidos: una sustitución de aminoácidos de la glicina con una asparagina, y una sustitución de aminoácidos de la fenilalanina con una cisteína (o treonina o serina), para crear un motivo de N-glucosilación de Asn-Arg-Ser/Thr/Cys. Por lo tanto, un experto en la técnica puede introducir uno o más sitios de N-glucosilación no nativos en cualquier posición en el polipéptido FIX.

La posición en la que se introduce un sitio de glucosilación no nativo en el polipéptido FIX para generar los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento se selecciona típicamente para que cualquier fracción de carbohidrato enlazado en ese sitio no interfiera negativamente con la estructura, función y/o actividad procoagulante del polipéptido FIX, o que las modificaciones de aminoácidos realizadas en el polipéptido para introducir el sitio de glucosilación no nativo no interfieran negativamente con la estructura, función o actividad del polipéptido FIX. Por lo tanto, se puede introducir un sitio de glucosilación no nativo en cualquier posición en un polipéptido FIX siempre que el polipéptido FIX modificado resultante retenga al menos una actividad del polipéptido FIX de tipo silvestre o no modificado. Por el contrario, uno o más sitios de glucosilación no nativos pueden introducirse en el polipéptido FIX modificado en sitios que pueden estar involucrados en la interacción de FIX con una molécula inhibidora. La fracción carbohidrato que está enlazado al nuevo sitio de glucosilación puede obstaculizar estéricamente la interacción entre la molécula inhibidora y el FIX modificado. Tal impedimento estérico puede dar como resultado un polipéptido FIX modificado con actividad coagulante incrementada. Por ejemplo, una fracción de carbohidrato que está unido a un sitio de glucosilación no nativo contenido en los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí puede obstaculizar estéricamente la interacción del FIX modificado con el complejo AT-III/heparina. Esto puede dar como resultado una mayor resistencia del polipéptido FIX modificado a los efectos inhibitorios de AT-III/heparina.

Por lo tanto, un sitio de glucosilación no nativo puede introducirse en el dominio Gla, el dominio EGF1, el dominio EGF2, el péptido de activación y/o el dominio de proteasa, siempre que el polipéptido FIX modificado resultante retenga al menos una actividad del tipo silvestre o polipéptido FIX no modificado. En otros ejemplos, se introduce un sitio de glucosilación no nativo en el dominio EGF2 o el dominio de proteasa. El polipéptido FIX modificado resultante retiene al menos una actividad del polipéptido FIX no modificado. En algunos ejemplos, el polipéptido FIX modificado retiene al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad catalítica del polipéptido FIX no modificado. En otros ejemplos, el polipéptido FIX modificado retiene al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad de unión para FX del polipéptido FIX no modificado. En otros ejemplos, el polipéptido FIX modificado retiene al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad de unión para FVIIIa del polipéptido FIX no modificado. En algunos ensayos y/o en algunas condiciones, los polipéptidos FIX modificados pueden exhibir una mayor actividad en comparación con la proteína FIX no modificada (por ejemplo, actividad farmacodinámica in vivo y/o actividad catalítica en presencia de ATIII/heparina o plasma)

La Tabla 3 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares, que corresponden a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FIX maduro como se establece en la SEQ ID NO: 3, que se incluyen en un polipéptido FIX modificado para aumentar los niveles de glucosilación al introducir un sitio de N-glucosilación no nativo. En referencia a tales mutaciones, el primer aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido que se reemplaza, el número corresponde a la posición en la secuencia del polipéptido FIX maduro con referencia a la SEQ ID NO: 3, y el segundo aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido seleccionado que reemplaza al

primer aminoácido en esa posición. Las posiciones de aminoácidos para la mutación también se mencionan mediante el esquema de numeración de quimotripsina cuando sea apropiado (es decir, cuando la mutación se encuentra dentro del dominio de proteasa FIX). En los casos en que una posición de aminoácido modificado no tiene un número de quimotripsina correspondiente (es decir, no está dentro de las posiciones de aminoácido 181 a 415 correspondientes a un polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3, y no se establece en la Tabla 1, arriba), la posición se indica entre paréntesis utilizando numeración FIX madura. Por ejemplo, A103N no tiene un número de quimotripsina correspondiente y se establece como A[103]N cuando se refiere a la numeración de quimotripsina. En la Tabla 3 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se establecen ejemplos de secuencias de aminoácidos del polipéptido FIX modificado. También se identifican en la Tabla 3 las posiciones de los sitios de glucosilación no nativos generados por las modificaciones.

En algunos casos, solo se requiere un reemplazo de aminoácidos para crear un sitio de N-glucosilación no nativo. Por ejemplo, el ácido aspártico (Asp, D) en la posición 85 (correspondiente al polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3) puede reemplazarse con una asparagina (Asn, N) para generar un sitio de glucosilación no nativo en el dominio EGF2 en la posición de aminoácido 85 en el polipéptido FIX modificado resultante. En otro ejemplo, la isoleucina (Ile, I) en la posición 251 (correspondiente al polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3) se puede reemplazar con una serina (Ser, S) para generar un sitio de N-glucosilación no nativa en el dominio de proteasa en la posición de aminoácido 249 en el polipéptido FIX modificado resultante. En otros casos, se requieren dos reemplazos de aminoácidos para crear un nuevo sitio de glucosilación. Por ejemplo, la alanina (Ala, A) en la posición 103 (basada en la numeración de un FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3) se puede reemplazar con una asparagina (Asn, N), y la asparagina en la posición 105 puede ser reemplazada con una serina (Ser, S) para crear un sitio de N-glucosilación no nativo en el dominio EGF2 en la posición de aminoácido 103 en el polipéptido FIX modificado resultante. En otro ejemplo, la treonina (Thr, T) en la posición 241 se reemplaza con una asparagina y la histidina (His, H) en la posición 243 se reemplaza con una serina para crear un sitio de N-glucosilación no nativo en el dominio de proteasa en posición de aminoácidos 243.

Tabla 3.

Modificación (numeración FIX madura)	Modificación (numeración de quimotripsina)	Sitio de glucosilación no nativo (numeración FIX madura)	Sitio de glucosilación no nativo (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
A103N/NI05S	A[103]N/N[105]S	N103	N[103]	77
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	N104	N[104]	78
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	N106	N[106]	79
D85N	D[85]N	N85	N[85]	80
D203N/F205T	D39N/F41T	N203	N39	99
K228N	K63N	N228	N63	101
I251S	I86S	N249	N84	103
A262S	A95bS	N260	N95	106
K413N	K243N	N413	N243	107
E410N	E240N	N410	N240	108
E239N	E74N	N239	N74	109
T241N/H243S	T76N/H78S	N241	N76	110
K247N/N249S	K82N/N84S	N247	N82	111
L321N	L153N	N321	N153	112
K392N/K394S	K222N/K224S	N392	N222	114
N260S	N95S	N258	N93	116
S319N/L321S	S151N/L153S	N319	N151	115
Y284N	Y117N	N284	N117	117
G317N	G149N	N317	N149	118
R318N/A320S	R150N/A152S	N318	N150	119
F314N/K316S	F145N/K148S	N314	N145	177

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden contener modificaciones que dan como resultado la introducción de dos o más sitios de N-glucosilación no nativos. Por ejemplo, las modificaciones establecidas en la Tabla 3 se pueden combinar, dando como resultado un polipéptido FIX modificado que contiene 2, 3, 4, 5, 6 o más sitios de N-glucosilación no nativos. Se pueden combinar dos o más de las modificaciones establecidas en la Tabla 3. Por ejemplo, se incluyen entre los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento los polipéptidos FIX modificados que contienen las sustituciones de aminoácidos D104N/K106S/K228N, lo que da como resultado un polipéptido FIX con dos sitios de glucosilación no nativos en las posiciones de aminoácidos 104 y 228, respectivamente (numeración correspondiente al polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3). En otro ejemplo, un polipéptido FIX modificado puede contener sustituciones de aminoácidos D85N/K247N/N249S/K392N/K394S, lo que da como resultado un polipéptido FIX con tres sitios de glucosilación no nativos en las posiciones de los aminoácidos 85, 247 y 392, respectivamente (numeración correspondiente al polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3). La Tabla 4 establece polipéptidos FIX ejemplares que tienen dos o más sitios de N-glucosilación no nativos.

Tabla 4.

Modificaciones (numeración FIX madura)	Modificaciones (numeración de quimotripsina)	Sitio de glucosilación no nativo (numeración FIX madura)	Sitio de glucosilación no nativo (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
D85N/I251S	D[85]N/186S	N85 y N149	N[85] y N84	104
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	N85 y N203	N[85] y N39	100
D85N/K228N	D[85]N/K63N	N85 y N228	N[85] y N63	102
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104N]/K[106]6/186S	N85, N104 y N249	N[85], N[104] y N84	105
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	N103 y N247	N[103] y N82	178
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	N104 y N247	N[104] y N82	179
K228N/I251S	K63N/I86S	N228 y N249	N63 y N84	180
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	N103 y N249	N[103] y N84	181
D104N/K106S/1251S	D[104]N/K[106]S/I86S	N104 y N249	N[104] y N84	182
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	N228 y N247	N63 y N82	183
K228N/K247N/N249S/D104N/K106S	K63N/K82N/N84S/D[104]N/K[106]S	N228, N247 y N104,	N63, N82 y N[104]	184
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	N104 y N258	N[104] y N93	185

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí pueden contener uno o más sitios de glucosilación no nativos, tales como uno o más sitios de N-glucosilación no nativos. Por lo tanto, cuando se expresa en una célula que facilita la glucosilación, o cuando se glucosila usando técnicas in vitro bien conocidas en la técnica, los polipéptidos FIX modificados pueden exhibir niveles aumentados de glucosilación en comparación con un polipéptido FIX no modificado. El nivel de glucosilación se puede aumentar al menos o 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 el nivel de glucosilación del polipéptido FIX de tipo silvestre o no modificado.

Las modificaciones descritas en el presente documento para introducir uno o más sitios de glucosilación no nativos pueden combinarse con cualquier otra mutación descrita en el presente documento o conocida en la técnica. Típicamente, el polipéptido FIX modificado resultante exhibe una actividad coagulante incrementada en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Por ejemplo, una o más modificaciones que introducen uno o más sitios de glucosilación no nativos se pueden combinar con modificaciones que aumentan la resistencia a un inhibidor, como AT-III y/o heparina, aumentan la actividad catalítica, aumentan la actividad intrínseca, aumentar la unión a fosfolípidos, disminuyen la unión a LRP y/o mejoran las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento que contienen uno o más sitios de glucosilación no nativos y tienen glucosilación alterada, como niveles elevados de glucosilación, retienen al menos una actividad de FIX, como, por ejemplo, actividad catalítica para su sustrato, FX. Típicamente, los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí retienen al menos o al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de La actividad catalítica exhibida por un polipéptido FIX no modificado. Los niveles aumentados de glucosilación pueden mejorar las propiedades farmacocinéticas de los polipéptidos FIX modificados al

dotar a la variante de una o más de las siguientes propiedades: i) depuración disminuido, ii) volumen de distribución alterado, iii) recuperación in vivo mejorada, iv) exposición de proteínas total mejorada in vivo (es decir, AUC), v) aumento de la vida media en suero (fase α, β, y/o γ), y/o vi) aumento del tiempo medio de resonancia (MRT) en comparación con un FIX no modificado. La actividad coagulante de los polipéptidos FIX modificados con glucosilación alterada se puede aumentar al menos o 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 FIX no modificada o de tipo silvestre in vivo o in vitro.

(b). Eliminación de sitios de glucosilación nativos.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí pueden tener un número reducido de sitios de glucosilación en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Típicamente, una reducción en el número de sitios de glucosilación da como resultado un nivel reducido de glucosilación en comparación con el polipéptido FIX no modificado. Los sitios de glucosilación nativos que pueden eliminarse incluyen, por ejemplo, sitios de N-glucosilación nativos en las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones 157 y 167 del FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3, y sitios de O-glucosilación nativos en posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones 53, 61, 159, 169, 172 y 179 del FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3.

Cualquiera o más sitios de glucosilación nativos pueden eliminarse mediante reemplazo(s) de aminoácidos, inserción(s) o deleción(es), o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, se puede hacer un reemplazo, deleción y/o inserción de aminoácidos para destruir el motivo Asn/Xaa/Ser/Thr/Cys (donde Xaa no es una prolina), eliminando así un sitio de N-glucosilación en la posición 157 o 167. En otros ejemplos, los sitios de O-glucosilación se eliminan, tal como mediante el reemplazo de aminoácidos o la deleción de los residuos de serina en las posiciones 53 o 61, o el reemplazo de aminoácidos o la deleción de los residuos de treonina en las posiciones 159 o 169. El polipéptido FIX modificado resultante retiene al menos una actividad del polipéptido FIX no modificado. En algunos ejemplos, el polipéptido FIX modificado retiene al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad catalítica del polipéptido FIX no modificado. En otros ejemplos, el polipéptido FIX modificado retiene al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad de unión para FX del polipéptido FIX no modificado. En otros ejemplos, el polipéptido FIX modificado retiene al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad de unión para FVIIIa del polipéptido FIX no modificado. En algunos ensayos y/o bajo algunas condiciones, los polipéptidos FIX modificados pueden exhibir propiedades mejoradas en comparación con FIX no modificado (por ejemplo, que incluyen, pero no están limitados a, aumento de la recuperación in vivo, aumento del AUC in vivo y/o disminución de la depuración in vivo).

La Tabla 5 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares, que corresponden a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FIX maduro como se establece en SEQ ID NO: 3, que se incluyen en un polipéptido FIX modificado para disminuir los niveles de glucosilación mediante la remoción o eliminación de un sitio nativo de N-glucosilación. En la Tabla 5 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se establecen secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido FIX modificado.

Tabla 5.

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
S53A	S[53]A	88
S61A	S[61]A	87
N157D	N[157]D	75
N157Q	N[157]Q	98
T159A	T[159]A	89
N167D	N[167]D	85
N167Q	N[167]Q	86
T169A	T[169]A	90
T172A	T[172]A	91
T179A	T[179]A	92

Las modificaciones descritas en el presente documento para eliminar uno o más sitios de glucosilación nativos se pueden combinar con cualquier otra mutación descrita en el presente documento o conocida en la técnica. Típicamente, el polipéptido FIX modificado resultante exhibe una actividad coagulante incrementada en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Por ejemplo, una o más modificaciones que eliminan uno o más sitios de glucosilación

nativos se pueden combinar con modificaciones que introducen un sitio de glucosilación no nativo, aumentan la resistencia a un inhibidor, como AT-III y/o heparina, aumentan la actividad catalítica, aumentan la actividad intrínseca, aumentan la unión a los fosfolípidos o mejoran las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento que eliminan uno o más sitios de glucosilación nativos retienen al menos una actividad de FIX, tal como, por ejemplo, actividad catalítica para su sustrato, FX. Típicamente, los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí retienen al menos o al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad catalítica exhibida por un polipéptido FIX no modificado. En algunos casos, la actividad coagulante de los polipéptidos FIX modificados con glucosilación alterada puede incrementarse en al menos o 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 FIX no modificado o de tipo silvestre in vivo o in vitro.

b. Mayor resistencia a AT-III y heparina.

La actividad de FIX puede inhibirse por factores en la sangre como parte de la regulación del proceso de coagulación. Por lo tanto, en este documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados que exhiben una resistencia aumentada a los efectos inhibitorios de los inhibidores, incluidos AT-III y heparina. En algunos ejemplos, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento muestran una afinidad de unión reducida por la heparina y/o una constante de velocidad de segundo orden disminuida para la inhibición por AT-III solo y/o el complejo AT-III/heparina. En otros ejemplos, los polipéptidos FIX modificados exhiben una resistencia incrementada al AT-III solo, o a la heparina sola. Por lo tanto, en este documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados que exhiben una resistencia incrementada a AT-III, el complejo AT-III/heparina y/o heparina.

i. AT-III

La antitrombina III (también conocida como antitrombina o AT-III) es una serpina anticoagulante importante (inhibidor de la serina proteasa). AT-III se sintetiza como una proteína precursora que contiene 464 residuos de aminoácidos (SEQ ID NO: 21). En el curso de la secreción, un péptido señal de 32 residuos se divide para generar una antitrombina humana madura de 432 aminoácidos (SEQ ID NO: 22). La glucoproteína AT-III de 58 kDa circula en la sangre y funciona como un inhibidor de la serina proteasa (serpina) para inhibir una gran cantidad de serina proteasas del sistema de coagulación. Los objetivos principales de AT-III son trombina, factor Xa y factor IXa, aunque también se ha demostrado que AT-III inhibe las actividades de FXIa, FXIIa y, en menor medida, FVIIa.

La acción de AT-III se ve mejorada en gran medida por los glicosaminoglucanos, como el heparán sulfato de origen natural o las diversas heparinas derivadas de tejidos que se usan ampliamente como anticoagulantes en la práctica clínica. A diferencia de otras serpinas, que típicamente son efectivas sin unirse a una molécula secundaria, la reacción de AT-III en ausencia de heparina con factores de coagulación objetivo es inusualmente lenta. En ausencia de heparina, la secuencia del bucle reactivo de AT-III proporciona los determinantes de la reactividad lenta. La mutagénesis de los residuos conservados de P2-P1 en el centro del bucle reactivo de AT-III, por ejemplo, afecta la interacción de AT-III con proteasas en ausencia, pero no la presencia de heparina.

AT-III se une de una manera altamente específica a una secuencia única de pentasacáridos en heparina que induce un cambio conformacional en el bucle central reactivo. En tal conformación, el bucle central reactivo de AT-III puede interactuar más eficientemente con el sitio reactivo de la serina proteasa, y efectuar la inhibición. La evidencia sugiere que la unión de la heparina a AT-III genera nuevos exositos que promueven la interacción de FIXa, trombina y FXa con AT-III. La tirosina en la posición 253 y el ácido glutámico en la posición 255, por ejemplo, han demostrado ser determinantes clave de un exosito en AT-III que se genera por la unión de heparina y que promueve la inhibición rápida y aumentada de FIXa por AT- III, en comparación con la inhibición observada con AT-III solo (Izaguirre et al., (2006) J. Bio Chem 281: 13424-13432).

Los estudios mutacionales también han dado alguna indicación de qué residuos en el Factor IXa están involucrados en la interacción con AT-III/heparina. Por ejemplo, la modificación de la arginina en la posición 318 del polipéptido FIX maduro (correspondiente a la posición 150 por numeración de quimotripsina) reduce la reactividad de este mutante con AT-III/heparina en 33 veces a 70 veces (Yang, L. et al, (2003) J. Biol. Chem. 278 (27): 25032-8). Sin embargo, el deterioro de la reactividad entre el mutante FIXa y AT-III no es tan notable cuando AT-III no está unido a la heparina, lo que indica que la interacción entre la arginina en la posición 318 del polipéptido FIXa maduro y AT-III se ve afectada cuando AT-III está en la conformación activada por heparina.

ii. Heparina

La heparina puede inhibir la actividad de FIXa en el complejo intrínseco de tenasa tanto de una manera dependiente de AT-III, como se discutió anteriormente, como de una manera independiente de AT-III. Los estudios indican que la inhibición independiente de AT-III de la actividad de FIXa por la heparina es el resultado de la unión de oligosacáridos a un exosito en FIXa que interrumpe la interacción FVIIIa-FIXa (Yuan et al., (2005) Biochem. 44: 3615-3625, Misenheimer et al., (2007) Biochem. 46: 7886-7895, Misenheimer et al. (2010) Biochem. 49: 9977-10005). El exosito de unión a

heparina está en el dominio de proteasa del Factor IXa, en una región electropositiva que se extiende desde la arginina en la posición 338 (correspondiente a la posición 170 por numeración de quimotripsina) hasta al menos la arginina en la posición 403 (correspondiente a la posición 233 por numeración de quimotripsina). Este exosito se superpone con una región de FIXa que es crítica para la interacción de FIXa con su cofactor, FVIIIa. Por lo tanto, la unión de la heparina a FIXa inhibe la interacción de FIXa con FVIIIa, reduciendo así la actividad intrínseca de la tenasa.

iii. Ejemplos de polipéptidos FIX con mayor resistencia a AT-III y heparina

Se pueden hacer modificaciones a un polipéptido FIX que aumenta su resistencia a AT-III, heparina y/o el complejo AT-III/heparina. Generalmente, dichos polipéptidos FIX modificados retienen al menos una actividad de un polipéptido FIX. Típicamente, tales modificaciones incluyen una o más sustituciones de aminoácidos en cualquier posición del polipéptido FIX que está implicada en la interacción de FIXa con AT-III, heparina y/o el complejo AT-III/heparina. Dichas modificaciones pueden, por ejemplo, dar como resultado una tasa reducida de interacción del polipéptido FIXa modificado con AT-III solo, una tasa reducida de interacción del polipéptido FIXa modificado con el complejo AT-III/heparina, y/o una afinidad de unión reducida del polipéptido FIXa modificado por la heparina sola. En algunos ejemplos, la(s) modificación(es) introduce uno o más sitios de glucosilación no nativos. La fracción de carbohidrato que está enlazada al nuevo sitio de glucosilación puede impedir estéricamente la interacción del FIX modificado con el complejo AT-III/heparina, lo que resulta en una mayor resistencia del polipéptido FIX modificado a los efectos inhibitorios de AT-III/heparina. Por lo tanto, los polipéptidos FIXa modificados exhiben una resistencia aumentada a los efectos inhibitorios naturales de AT-III, AT-III/heparina y/o heparina con respecto a la actividad intrínseca de la tenasa. Cuando se evalúa en un ensayo in vitro apropiado, o in vivo, como después de la administración a un sujeto como agente terapéutico procoagulante, los polipéptidos FIX modificados muestran una mayor actividad coagulante en comparación con los polipéptidos FIX no modificados.

Como se describe a continuación en el presente documento, un experto en la técnica puede diseñar empírica o racionalmente polipéptidos FIXa modificados que muestran una resistencia incrementada a AT-III, AT-III/heparina y/o heparina. Dichos polipéptidos FIX modificados se pueden probar en ensayos conocidos por un experto en la materia para determinar si los polipéptidos FIX modificados muestran una mayor resistencia a AT-III, AT-III/heparina y/o heparina. Por ejemplo, los polipéptidos FIX modificados pueden analizarse para determinar la unión a AT-III, AT-III/heparina y/o heparina. En general, un polipéptido FIX modificado que tiene una resistencia incrementada a AT-III, AT-III/heparina y/o heparina exhibirá una unión disminuida y/o una afinidad disminuida por la heparina y/o una tasa disminuida de interacción con AT-III y/o AT-III/heparina. Típicamente, tales ensayos se realizan con la forma activada de FIX (FIXa), y en presencia o ausencia del cofactor, FVIIIa y fosfolípidos.

En este documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados que exhiben una resistencia incrementada a AT-III, AT-III/heparina y/o heparina. Las variantes de polipéptido FIX proporcionadas en el presente documento se han modificado en la posición de aminoácidos 318 (correspondiente a 150, por numeración de quimotripsina) y que se pueden haber modificado en una o más de las posiciones de aminoácidos 202, 203, 204, 205, 228, 239, 257, 260, 293, 312, 316, 319, 321, 333, 338, 342, 346, 400, 403 o 410 (correspondientes a las posiciones de aminoácidos 38, 39, 40, 41, 63, 74, 92, 95, 126, 143, 145, 148, 151, 153, 165, 170, 174, 178, 230, 233 y 240 respectivamente, por numeración de quimotripsina). Estos residuos de aminoácidos pueden modificarse, tal como mediante remplazo, sustitución, deleción de aminoácido. Los residuos identificados se pueden reemplazar o sustituir con cualquier otro aminoácido. Alternativamente, las inserciones de aminoácidos pueden usarse para alterar la conformación de un residuo de aminoácido dirigido o la estructura de la proteína en la vecindad de un residuo de aminoácido dirigido.

Cualquier residuo de aminoácido puede ser sustituido por el residuo de aminoácido endógeno en las posiciones identificadas. Típicamente, el aminoácido de reemplazo se elige de modo que interfiera con la interacción entre FIX y AT-III o heparina. Por ejemplo, se pueden hacer modificaciones en las posiciones de aminoácidos 260, 293, 333, 338, 346, 400 y 410 (correspondientes a las posiciones de aminoácidos 95, 126, 165, 170, 178, 230, 233 y 240, respectivamente, por numeración de quimotripsina) para interferir con la interacción del polipéptido FIX con heparina. En otros ejemplos, se realizan modificaciones en las posiciones de aminoácidos 203, 204, 205, 228, 239, 312, 314, 316, 318, 319, 321 y 342 (correspondientes a las posiciones de aminoácidos 39, 40, 41, 63, 74, 143, 145, 148, 150, 151, 153 y 174, respectivamente, por numeración de quimotripsina) para interferir con la interacción del polipéptido FIX con AT-III.

En algunos ejemplos, se introduce un nuevo sitio de glucosilación mediante el reemplazo de aminoácidos. La fracción de carbohidrato que está enlazada al nuevo sitio de glucosilación puede impedir estéricamente la interacción del FIX modificado con el complejo AT-III/heparina, lo que resulta en una mayor resistencia del polipéptido FIX modificado a los efectos inhibitorios de AT-III0/heparina. Por ejemplo, el ácido glutámico (Glu, E) en la posición 410 (correspondiente a la posición 240 por numeración de quimotripsina) se puede reemplazar con una asparagina (Asn, N) para introducir un nuevo sitio de glucosilación en la posición 410. En otros ejemplos, el ácido glutámico (Glu, E) en la posición 239 (correspondiente a la posición 74 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con una asparagina (Asn, N) para introducir un nuevo sitio de glucosilación en la posición 239. Otras mutaciones que introducen un nuevo sitio de glucosilación para aumentar la resistencia a AT-III/heparina incluye, por ejemplo, D203N/F205T, R318N/A320S, N260S y F314N/K316S (correspondientes a D39N/F41T, R150N/A152S, N95S y F145N/K148S por numeración de quimotripsina).

En otros ejemplos en los que se realizan modificaciones para aumentar la resistencia a AT-III, AT-III/heparina y/o heparina, el residuo de valina en la posición 202 (correspondiente a la posición 38 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con una metionina (Met, M) o tirosina (Tyr, Y); el ácido aspártico (Asp, D) en la posición 203 (correspondiente a la posición 39 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con una metionina (Met, M) o tirosina (Tyr, Y); la alanina (Ala, A) en la posición 204 (correspondiente a la posición 40 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con una metionina (Met, M) o tirosina (Tyr, Y); el ácido glutámico en la posición 239 (correspondiente a la posición 74 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con serina (Ser, S), alanina (Ala, A), arginina (Arg, R) o lisina (Lys, K); la histidina en la posición 257 (correspondiente a la posición 92 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y), ácido glutámico (Glu, E) o serina (Ser, S); la lisina (Lys, K) en la posición 293 (correspondiente a la posición 143 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con alanina (Ala, A) o glutamina (Gln, Q); la arginina (Arg, R) en la posición 312 (correspondiente a la posición 143 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con alanina (Ala, A) o glutamina (Gln, Q); la lisina en la posición 316 (correspondiente a 148 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con asparagina (Asn, N), alanina (Ala, A), ácido glutámico (Glu, E), serina (Ser, S) o metionina (Met, M); la arginina (Arg, R) en la posición 318 (correspondiente a la posición 150 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con alanina (Ala, A), ácido glutámico (Glu, E) tirosina (Tyr, Y), fenilalanina (Phe, F)) o triptófano (Trp, W); la arginina (Arg, R) en la posición 333 (correspondiente a la posición 165 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con alanina (Ala, A) o ácido glutámico (Glu, E); la arginina (Arg, R) en la posición 338 (correspondiente a la posición 170 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con alanina (Ala, A) o ácido glutámico (Glu, E); la lisina (Lys, K) en la posición 400 (correspondiente a la posición 230 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con alanina (Ala, A) o ácido glutámico (Glu, E); y/o la arginina (Arg, R) en la posición 403 (correspondiente a la posición 233 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con alanina (Ala, A), ácido glutámico (Glu, E) o ácido aspártico (Asp, D).

En este documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados de acuerdo con las reivindicaciones que contienen un reemplazo de aminoácidos en el residuo R318 o en un residuo en un polipéptido FIX correspondiente a 318 que es una tirosina, por ejemplo, R318Y, o es un reemplazo de aminoácidos conservador del mismo. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos conservadores para la tirosina incluyen, pero no se limitan a, fenilalanina (F) o triptófano (W). También se proporcionan polipéptidos FIX modificados que contienen un reemplazo de aminoácidos en el residuo R403 o en un residuo en un polipéptido FIX correspondiente a 403 que es un ácido glutámico, por ejemplo, R403E, o es un reemplazo de aminoácidos conservador del mismo. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos conservadores para el ácido glutámico incluyen, pero no se limitan a, ácido aspártico (D).

En una realización adicional, se pueden generar mutantes combinados. Se incluyen entre tales mutantes combinados los que tienen dos o más mutaciones en las posiciones de aminoácidos 202, 203, 204, 257, 239, 293, 312, 316, 318, 333, 338, 400, 403 y 410 (correspondientes a las posiciones de aminoácidos 38, 39, 40, 74, 92, 126, 143, 148, 150, 165, 170, 230, 233 y 240, respectivamente, por numeración de quimotripsina). Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado puede poseer sustituciones de aminoácidos en 2, 3, 4, 5 o más de las posiciones identificadas. Por lo tanto, un polipéptido modificado puede mostrar 1, 2, 3, 4, 5 o más mutaciones que pueden dar como resultado una mayor resistencia del polipéptido FIX modificado a los efectos inhibitorios de AT-III, AT-III/heparina y/o heparina. Cualquiera o más de las mutaciones descritas en el presente documento para aumentar la resistencia del polipéptido FIX modificado a los efectos inhibitorios de AT-III, AT-III/heparina y/o heparina pueden combinarse.

La Tabla 6 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares en los residuos identificados, que corresponden a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FIX maduro como se establece en la SEQ ID NO: 3. Se incluyen entre estas mutaciones combinadas ejemplares. Como se señaló, dichos polipéptidos FIX están diseñados para aumentar la resistencia a AT-III, AT-III/heparina y/o heparina y, por lo tanto, tienen una mayor actividad coagulante in vivo, ex vivo o en ensayos in vitro que incluyen ATIII, heparina/ATIII, heparina, plasma, suero o sangre. En referencia a tales mutaciones, el primer aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido que se reemplaza, el número corresponde a la posición en la secuencia del polipéptido FIX maduro con referencia a la SEQ ID NO: 3, y el segundo aminoácido ácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido seleccionado que reemplaza al primer aminoácido en esa posición. Las posiciones de aminoácidos para la mutación también se mencionan mediante el esquema de numeración de quimotripsina. En la Tabla 6 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se establecen secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido FIX modificado.

Tabla 6.

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
R318A	R150A	120
R318E	R150E	121
R318Y	R150Y	122
R318F	R150F	413

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
R318W	R150W	414
R312Q	R143Q	123
R312A	R143A	124
R312Y	R143Y	125
R312L	R143L	126
V202M	V38M	127
V202Y	V38Y	128
D203M	D39M	129
D203Y	D39Y	130
A204M	A40M	131
A204Y	A40Y	132
K400A/R403A	K230A/R233A	133
K400E/R403E	K230E/R233E	134
R403A	R233A	135
R403E	R233E	136
R403D	R233D	417
K400A	K230A	137
K400E	K230E	138
K293E	K126E	139
K293A	K126A	140
R333A	R165A	141
R333E	R165E	142
R333S	R165S	186
R338A	R170A	143
R338E	R170E	144
R338L	R170L	187
R338A/R403A	R170A/R233A	145
R338E/R403E	R170E/R233E	146
K293A/R403A	K126A/R233A	147
K293E/R403E	K126E/R233E	148
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	149
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	150
R318A/R403A	R150A/R233A	151
R318E/R403E	R150E/R233E	152
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	156
R318Y/R338E	R150Y/R170E	188
R318N/A320S	R150N/A152S	119
K316N	K148N	189
K316A	K148A	190
K316E	K148E	191

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
K316S	K148S	192
K316M	K148M	193
E239N	E74N	109
E239S	E74S	194
E239A	E74A	195
E239R	E74R	196
E239K	E74K	197
H257F	H92F	198
H257Y	H92Y	199
H257E	H92E	200
H257S	H92S	201
E410N	E240N	108
N260S	N95S	116
F314N/K316S	F145N/K148S	113

Las modificaciones descritas en el presente documento para aumentar la resistencia a un inhibidor, como AT-III y/o heparina, se pueden combinar con cualquier otra mutación descrita en el presente documento o conocida en la técnica. Típicamente, el polipéptido FIX modificado resultante exhibe una actividad coagulante incrementada en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Por ejemplo, una o más modificaciones que aumentan la resistencia a un inhibidor, como AT-III y/o heparina, se pueden combinar con modificaciones que introducen un sitio de glucosilación no nativo, eliminan uno o más sitios de glucosilación nativos, eliminan uno o más de los sitios nativos de sulfatación, fosforilación o hidroxilación, aumentan la actividad catalítica, aumentan la actividad intrínseca, aumentan la unión a los fosfolípidos o mejoran las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas. El polipéptido FIX modificado resultante exhibe típicamente una actividad coagulante incrementada en comparación con un polipéptido FIX no modificado.

Los polipéptidos FIX modificados que tienen resistencia aumentada para AT-III solo, el complejo AT-III/heparina y/o heparina sola, pueden exhibir una reducción en la afinidad por la heparina, el grado de inhibición en condiciones específicas, o en el constante de velocidad de segundo orden para la inhibición por ATIII o heparina/ATIII al menos o al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más en comparación con la afinidad, el grado de inhibición o la constante de velocidad de segundo orden para la inhibición de polipéptido FIX no modificado o de tipo silvestre in vivo o in vitro. Por lo tanto, los polipéptidos FIX modificados pueden exhibir una mayor resistencia a AT-III solo, al complejo AT-III/heparina y/o heparina sola que es al menos o 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 de la resistencia exhibida por un polipéptido FIX no modificado. El aumento de la resistencia a AT-III, el complejo AT-III/heparina y/o la heparina por dichos polipéptidos FIX modificados también puede manifestarse como una mayor actividad de coagulación o una mejor duración de la actividad de coagulación in vivo o in vitro en presencia de AT- III, el complejo AT-III/heparina, heparina, sangre, plasma o suero. La actividad de coagulación de los polipéptidos FIX modificados se puede aumentar en 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 FIX de tipo silvestre o no modificado in vivo o in vitro. Los polipéptidos FIX modificados que contienen modificaciones que aumentan la resistencia a AT-III, el complejo heparina/AT-III y/o la heparina también pueden exhibir un índice terapéutico mejorado en comparación con FIXa no modificado.

C. Mutaciones para aumentar la actividad catalítica.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí pueden contener una o más modificaciones para aumentar la actividad catalítica del polipéptido en comparación con un FIX no modificado. Por ejemplo, se pueden hacer modificaciones a los aminoácidos que están involucrados en la interacción de FIX con su cofactor, FVIIIa, de modo que el polipéptido FIX modificado resultante tenga una mayor afinidad por FVIIIa y, por lo tanto, muestre una mayor actividad hacia FX en condiciones en las que FVIIIa no está presente en concentraciones saturantes. También se pueden hacer modificaciones en el dominio de proteasa del polipéptido FIX, de modo que la actividad o la eficiencia catalítica del polipéptido FIX modificado para la activación de FX, en presencia y/o ausencia del cofactor FVIIIa, se incremente en comparación con la actividad o eficiencia catalítica del polipéptido no modificado.

Las modificaciones ejemplares que pueden incluirse en los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento incluyen reemplazos de aminoácidos en las posiciones 259, 265, 345, 410 y 412 (correspondientes a 94, 98, 177, 240 y 242 por numeración de quimotripsina). Los aminoácidos en estas posiciones pueden reemplazarse por cualquier otro residuo de aminoácido. En algunos ejemplos, la tirosina en la posición 259 se reemplaza con una fenilalanina; la lisina en la posición 265 se reemplaza con una treonina; y/o la tirosina en la posición 345 se reemplaza con una treonina. En otro ejemplo, el ácido glutámico en la posición 410 se reemplaza con una glutamina, serina, alanina o ácido aspártico. En un ejemplo, la treonina en la posición 412 se reemplaza con una valina o una alanina.

Las modificaciones mencionadas anteriormente son solo ejemplares. Muchas otras modificaciones descritas en el presente documento también dan como resultado una mayor actividad catalítica. Por ejemplo, las modificaciones que se introducen en el polipéptido FIX para aumentar la resistencia a un inhibidor, como AT-III y/o heparina, introducen un sitio de glucosilación no nativo, eliminan uno o más sitios de glucosilación nativos, eliminan uno o más de los sitios nativos de sulfatación, fosforilación o hidroxilación, aumenta la actividad intrínseca, aumenta la unión a los fosfolípidos, disminuye la unión a LRP y/o mejora las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas, también puede dar como resultado un polipéptido FIX modificado que exhibe una mayor actividad.

La Tabla 7 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares en los residuos identificados, que corresponden a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FIX maduro como se establece en la SEQ ID NO: 3. En referencia a tales mutaciones, el primer aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido que se reemplaza, el número corresponde a la posición en la secuencia del polipéptido FIX maduro con referencia a la SEQ ID NO: 3, y el segundo aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido seleccionado que reemplaza al primer aminoácido en esa posición. Las posiciones de aminoácidos para la mutación también se mencionan mediante el esquema de numeración de quimotripsina. En la Tabla 7 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se establecen ejemplos de secuencias de aminoácidos del polipéptido FIX modificado.

Tabla 7.

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
T412A	T242A	202
T412V	T242V	203
E410Q	E240Q	174
E410S	E240S	175
E410A	E240A	176
E410D	E240D	206
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	216

Las modificaciones descritas en el presente documento para aumentar la actividad catalítica pueden combinarse con cualquier otra mutación descrita en el presente documento o conocida en la técnica. Típicamente, el polipéptido FIX modificado resultante exhibe una actividad coagulante incrementada en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Por ejemplo, una o más modificaciones que aumentan la actividad catalítica pueden combinarse con modificaciones que aumentan la resistencia a un inhibidor, como AT-III y/o heparina, introducen un sitio de glucosilación no nativo, eliminan uno o más sitios de glucosilación nativa, eliminan uno o más de los sitios nativos de sulfatación, fosforilación o hidroxilación, aumentan la actividad intrínseca, aumentan la unión a los fosfolípidos o mejoran las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas. El polipéptido FIX modificado resultante exhibe típicamente una actividad coagulante incrementada en comparación con un polipéptido FIX no modificado.

Los polipéptidos FIX modificados que tienen actividad catalítica incrementada pueden exhibir al menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más de actividad en comparación con la actividad catalítica del polipéptido FIX no modificado o de tipo silvestre, in vivo o in vitro. El aumento de la actividad catalítica de dichos polipéptidos FIX modificados también puede manifestarse como un aumento de la actividad de coagulación, la duración de la actividad de coagulación y/o un índice terapéutico mejorado. La actividad de coagulación de los polipéptidos FIX modificados se puede aumentar al menos o 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 FIX no modificado de tipo silvestre in vivo o in vitro.

d. Mutaciones para disminuir la unión de LRP

FIXa se puede depurar de la circulación sistémica uniendo la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP), que es una glicoproteína de membrana que se expresa en una variedad de tejidos, que incluyen

hígado, cerebro, placenta y pulmón. Por lo tanto, aquí se proporcionan polipéptidos FIX modificados que exhiben una unión disminuida al LRP. Esto puede dar como resultado propiedades farmacocinéticas mejoradas del polipéptido FIX modificado, que incluye, por ejemplo, i) depuración disminuida, ii) volumen de distribución alterado, iii) recuperación in vivo mejorada, iv) exposición proteica total mejorada in vivo (es decir, AUC), v) aumento de la semivida sérica (fase α, β y/o γ), y/o vi) aumento del tiempo medio de resonancia (MRT). Tales polipéptidos FIX modificados pueden exhibir una actividad coagulante incrementada.

El polipéptido FIX modificado proporcionado aquí puede contener una o más modificaciones en el sitio de unión a LRP. Se postula que este sitio de unión está ubicado en un bucle en el dominio de proteasa que abarca los residuos 342 a 346 del polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3. La modificación de uno o más de los residuos en las posiciones 342-346 (correspondientes a las posiciones 174-178 por numeración de quimotripsina), como por reemplazo, inserción o deleción de aminoácidos, puede interferir con la interacción entre el polipéptido FIX modificado y LRP, lo que resulta en disminución de la afinidad de unión. La unión de los polipéptidos FIX modificados a LRP puede probarse usando ensayos conocidos por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Rohlena et al., (2003) J. Biol. Chem. 278: 9394-9401). Las propiedades farmacocinéticas mejoradas resultantes también se pueden probar usando ensayos in vivo bien conocidos, incluidos los que se describen a continuación.

Las modificaciones ejemplares que pueden incluirse en los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento incluyen reemplazos de aminoácidos en las posiciones 343, 344, 345 y 346 (correspondientes a 175, 176, 177 y 178 por numeración de quimotripsina). Los aminoácidos en estas posiciones pueden reemplazarse por cualquier otro residuo de aminoácido. En algunos ejemplos, la treonina en la posición 343 se reemplaza con una glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; la fenilalanina en la posición 344 se reemplaza con una isoleucina; la tirosina en la posición 345 se reemplaza con una treonina, alanina o una alanina; y/o la asparagina en la posición 346 se reemplaza con un ácido aspártico o una tirosina. Cualquiera o más de estos reemplazos de aminoácidos ejemplares se pueden combinar entre sí o con otras modificaciones descritas en este documento.

En este documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados que contienen un reemplazo de aminoácidos en el residuo T343 o en un residuo en un polipéptido FIX correspondiente a 343 que es una arginina, por ejemplo, T343R, o es un reemplazo de aminoácidos conservador del mismo. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos conservadores para la arginina incluyen, pero no se limitan a, lisina (K).

La Tabla 8 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares en los residuos identificados, que corresponden a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FIX maduro como se establece en la SEQ ID NO: 3. En referencia a tales mutaciones, el primer aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido que se reemplaza, el número corresponde a la posición en la secuencia del polipéptido FIX maduro con referencia a la SEQ ID NO: 3, y el segundo aminoácido (abreviatura de una letra) corresponde al aminoácido seleccionado que reemplaza al primer aminoácido en esa posición. Las posiciones de aminoácidos para la mutación también se mencionan mediante el esquema de numeración de quimotripsina. En la Tabla 8 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se establecen ejemplos de secuencias de aminoácidos del polipéptido FIX modificado.

Tabla 8.

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
N346D	N178D	207
N346Y	N178Y	208
T343R	T175R	209
T343E	T175E	210
T343D	T175D	416
T343Q	T175Q	211
F342I	F174I	212
Y345A	Y177A	213
Y345T	Y177T	214
T343R/Y345T	T175R/Y177T	215
T343R/N346D	T175R/N178D	409
T343R/N346Y	T175R/N178Y	410

Las modificaciones descritas en el presente documento para disminuir la unión a LRP se pueden combinar con cualquier otra mutación descrita en el presente documento o conocida en la técnica. Típicamente, el polipéptido FIX modificado resultante exhibe una actividad coagulante incrementada en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Por ejemplo, una o más modificaciones que disminuyen la unión a LRP se pueden combinar con modificaciones que aumentan la resistencia a un inhibidor, tal como AT-III y/o heparina, aumentan la actividad catalítica, introducen un sitio de glucosilación no nativo, eliminan uno o más sitios de glucosilación nativos, eliminan uno o más de los sitios nativos de sulfatación, fosforilación o hidroxilación, aumentan la actividad en presencia y/o ausencia de FVIIIa, aumentan la unión a fosfolípidos o mejoran las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas. El polipéptido FIX modificado resultante exhibe típicamente una actividad coagulante incrementada en comparación con un polipéptido FIX no modificado.

Los polipéptidos FIX modificados que tienen una unión disminuida a LRP pueden exhibir una disminución de al menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más en comparación con la unión de polipéptido FIX no modificado o de tipo silvestre a LRP in vitro. La disminución de la unión a LRP por dichos polipéptidos FIX modificados puede dar como resultado propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como i) disminución de la depuración, ii) volumen de distribución alterado, iii) recuperación in vivo mejorada, iv) exposición a proteínas totales mejorada in vivo (es decir, AUC), v) aumento de la vida media en suero (fase α, β, y/o γ), y/o vi) aumento del tiempo medio de resonancia (MRT). Además, tales alteraciones pueden dar como resultado un aumento de la actividad coagulante, la duración de la actividad de coagulación y/o un índice terapéutico mejorado. La actividad de coagulación de los polipéptidos FIX modificados se puede aumentar al menos o 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 FIX no modificado o de tipo silvestre o in vivo o in vitro.

e. Otras mutaciones para alterar la modificación postraduccional

La FIX de tipo silvestre se modifica postraduccionalmente tras la expresión en células de mamífero. El polipéptido precursor del Factor IX sufre una extensa modificación postraduccional para convertirse en el zimógeno maduro que se secreta en la sangre. Dichas modificaciones postraduccionales incluyen γ-carboxilación, β-hidroxilación, glucosilación enlazada a O y N, sulfatación y fosforilación. Como se discutió anteriormente, los niveles de glucosilación pueden alterarse, por ejemplo, introduciendo nuevos sitios de glucosilación no nativos y/o eliminando sitios de glucosilación nativos. De manera similar, se pueden alterar otras modificaciones postraduccionales, como la introducción y/o eliminación de sitios de γ-carboxilación, β-hidroxilación, sulfatación y/o fosforilación.

Cualquiera o más de los sitios de γ-carboxilación, β-hidroxilación, sulfatación o fosforilación nativos pueden eliminarse, tal como por sustitución o deleción de aminoácidos. Por ejemplo, los polipéptidos FIX no modificados pueden modificarse mediante el reemplazo de aminoácidos de uno o más de los doce residuos de ácido glutámico (correspondientes a las posiciones 7, 8, 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30, 33, 36 y 40 del FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3) en el dominio Gla. Estos residuos típicamente son γ-carboxilados a γ-carboxiglutamilo (o Gla) en FIX de tipo silvestre. Por lo tanto, la eliminación de los residuos de ácido glutámico, como por sustitución o deleción de aminoácidos, puede reducir el nivel de γ-carboxilación en un polipéptido FIX modificado en comparación con el polipéptido FIX no modificado. De manera similar, el residuo de ácido aspártico en la posición 64, que normalmente está β-hidroxilado en FIX de tipo silvestre, puede eliminarse, tal como mediante sustitución o deleción de aminoácidos. Los sitios de modificación postraduccionales adicionales que pueden eliminarse incluyen, por ejemplo, la tirosina en la posición 155, que típicamente está sulfatada en FIX de tipo silvestre, y el residuo de serina en la posición 158, que típicamente está fosforilada en FIX de tipo silvestre.

En otros ejemplos, se pueden introducir sitios de modificación postraduccionales no nativos, tales como por remplazo o inserción de aminoácidos. Por ejemplo, se pueden introducir residuos adicionales de ácido glutámico en el dominio Gla. Dichos residuos de ácido glutámico podrían estar γ-carboxilados a γ-carboxiglutamilo (o Gla) en el polipéptido FIX modificado tras la expresión en, por ejemplo, una célula de mamífero. De manera similar, se pueden introducir uno o más sitios de β-hidroxilación, sulfatación o fosforilación no nativos.

En este documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados que tienen uno o más de los sitios de modificación postraduccionales nativos eliminados. Los polipéptidos FIX modificados que se han modificado para eliminar uno o más sitios de modificación postraduccionales, incluyen los sitios de γ-carboxilación, β-hidroxilación, sulfatación y/o fosforilación, retienen al menos una actividad del polipéptido FIX no modificado. En algunos ejemplos, el polipéptido FIX modificado retiene al menos o al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad catalítica del polipéptido FIX no modificado. En otros ejemplos, el polipéptido FIX modificado retiene al menos o al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad de unión para FVIIIa del polipéptido FIX no modificado. En algunos ensayos y/o en algunas condiciones, los polipéptidos FIX modificados pueden exhibir una mayor actividad en comparación con la proteína FIX no modificada (por ejemplo, mayor actividad farmacodinámica in vivo y/o actividad en presencia de AT-III/heparina o plasma).

En este documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados que contienen un reemplazo de aminoácidos en el residuo Y155 o en un residuo en un polipéptido FIX correspondiente a 155 que es una fenilalanina, por ejemplo, Y155F, o es un reemplazo conservador de aminoácidos del mismo. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos conservadores para fenilalanina incluyen, pero no están limitados a, metionina (M), leucina (L) o tirosina (Y).

La Tabla 9 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares, que corresponden a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FIX maduro como se establece en SEQ ID NO: 3, que se incluyen en un polipéptido FIX modificado para eliminar unos sitios de β- hidroxilación, sulfatación y/o fosforilación nativos en las posiciones 64, 155 y 158, respectivamente. En la Tabla 9 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se establecen ejemplos de secuencias de aminoácidos del polipéptido FIX modificado.

Tabla 9.

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
D64N	D[64]N	83
D64A	D[64]A	84
Y155F	Y[155]F	76
Y155H	Y[155]H	93
Y155Q	Y[155]Q	94
T155L	Y[155]L	415
S158A	S[158]A	95
S158D	S[158]D	96
S158E	S[158]E	97

Las modificaciones descritas en el presente documento para eliminar los sitios de β-hidroxilación, sulfatación y/o fosforilación pueden combinarse con cualquier otra mutación descrita en el presente documento o conocida en la técnica. Típicamente, el polipéptido FIX modificado resultante exhibe una actividad coagulante incrementada en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Por ejemplo, una o más modificaciones que eliminan uno o más sitios nativos de β-hidroxilación, sulfatación y/o fosforilación pueden combinarse con modificaciones que aumentan la resistencia a un inhibidor, como AT-III y/o heparina, alteran la glucosilación, tal como aumentar la glucosilación, aumentar la actividad catalítica, aumentar la actividad intrínseca, aumentar la unión a los fosfolípidos o mejorar las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento que eliminan uno o más sitios nativos de β-hidroxilación, sulfatación y/o fosforilación retienen al menos una actividad de FIX, tal como, por ejemplo, actividad catalítica para su sustrato, FX o unión a el cofactor, FVIIIa. Típicamente, los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí retienen al menos o al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad catalítica exhibida por un polipéptido FIX no modificado. En algunos casos, la actividad coagulante de los polipéptidos FIX modificados aumenta al menos o 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 FIX no modificado o de tipo silvestre in vivo o in vitro.

2. Modificaciones de combinación

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento que contienen uno o más sitios de glucosilación no nativos, tienen uno o más sitios de glucosilación nativos eliminados, tienen uno o más sitios de β-hidroxilación, sulfatación y/o fosforilación nativos eliminados, o que tienen modificaciones que pueden dar como resultado una mayor resistencia a los inhibidores, como AT-III, AT-III/heparina y/o heparina, en comparación con un polipéptido FIX de tipo silvestre, también pueden contener otras modificaciones. En algunos ejemplos, los polipéptidos FIX modificados contienen modificaciones que introducen uno o más sitios de glucosilación no nativos y también contienen modificaciones que interfieren con la interacción entre FIX e inhibidores, como AT-III, el complejo AT-III/heparina y/o y heparina. En otros ejemplos, las modificaciones que eliminan uno o más sitios nativos de β-hidroxilación, sulfatación y/o fosforilación pueden combinarse con modificaciones que aumentan la resistencia a los inhibidores, y/o modificaciones que introducen uno o más sitios de glucosilación. Por lo tanto, una o más de las mutaciones establecidas en las Tablas 3-9 anteriores, se pueden combinar con cualquiera de las otras mutaciones establecidas en las Tablas 3-9 anteriores. Por lo tanto, se incluyen entre los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento aquellos que exhiben glucosilación aumentada, tal como N-glucosilación; resistencia aumentada a AT-III, AT-III/heparina, y/o heparina; disminución de β-hidroxilación, sulfatación y/o fosforilación; y/o actividad catalítica incrementada en comparación con un polipéptido FIX no modificado.

Además, cualquiera de los polipéptidos FIX modificados proporcionados en la presente memoria puede contener una o más modificaciones adicionales. En algunos ejemplos, las modificaciones adicionales resultan en propiedades y/o actividades alteradas en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Típicamente, tales modificaciones adicionales son aquellas que dan como resultado por sí mismas un aumento de la actividad coagulante del polipéptido modificado y/o un aumento de la estabilidad del polipéptido. Por consiguiente, los polipéptidos FIX modificados resultantes exhiben típicamente una actividad coagulante incrementada.

Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, cualquier sustitución, deleción o inserción de aminoácidos conocida en la técnica, típicamente cualquiera que aumente la actividad coagulante y/o la estabilidad del polipéptido FIX. Cualquier polipéptido FIX modificado proporcionado en este documento puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 modificaciones adicionales de aminoácidos. Típicamente, el polipéptido FIX modificado resultante retiene al menos una actividad del polipéptido de tipo silvestre o no modificado, tal como, por ejemplo, actividad catalítica o unión al cofactor, FVIIIa.

Se pueden hacer modificaciones adicionales en la secuencia primaria al polipéptido FIX para efectuar modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden contener sitios de glucosilación no nativos, incluidos y distintos de los descritos anteriormente, tales como cualquiera de los descritos en la técnica, incluidos los sitios de glucosilación enlazados a O o enlazados a S no nativos descritos en la Publicación de Patente de los EE. UU. No. 20080280818, o los sitios de glucosilación no nativos descritos en las Publicaciones de Patentes Internacionales Nos. WO20091300198 y WO2009137254.

En otros ejemplos, la modificación adicional se puede hacer a la secuencia de polipéptidos FIX de tal manera que se altera su interacción con otros factores, moléculas y proteínas. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos que están involucrados en la interacción con el Factor X pueden modificarse de tal manera que aumente la afinidad y/o unión del polipéptido FIX modificado a FX. Otras modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificación de aminoácidos que están involucrados en interacciones con FVIIIa, heparina, antitrombina III y fosfolípidos.

También se pueden hacer modificaciones adicionales a un polipéptido FIX modificado proporcionado aquí que altera la conformación o plegamiento del polipéptido. Estos incluyen, por ejemplo, el reemplazo de uno o más aminoácidos con una cisteína de manera que se forme un nuevo enlace disulfuro, o modificaciones que estabilicen una conformación de hélice α, impartiendo así una mayor actividad al polipéptido FIX modificado.

También se pueden hacer modificaciones para introducir residuos de aminoácidos que pueden unirse posteriormente a una fracción, tal como uno que actúa para aumentar la estabilidad del polipéptido FIX modificado. Por ejemplo, se pueden introducir residuos de cisteína para facilitar la conjugación a un polímero, como el polietilenglicol (PEG) (Publicación de Patente Internacional No. WO2009140015). La estabilidad de un polipéptido FIX también se puede alterar modificando sitios proteolíticos potenciales, como la eliminación de sitios proteolíticos potenciales, aumentando así la resistencia del polipéptido FIX modificado a las proteasas (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. No. 20080102115).

Además, las sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos se pueden realizar en el dominio Gla endógeno de modo que el polipéptido FIX modificado muestre una mayor unión y/o afinidad por las membranas de fosfolípidos. Dichas modificaciones pueden incluir la sustitución, deleciones y/o inserciones de aminoácidos individuales, o pueden incluir la sustitución, deleción o inserción de aminoácidos de múltiples aminoácidos. Por ejemplo, todo o parte del dominio Gla endógeno puede reemplazarse con todo o parte de un dominio Glaheterólogo. En otros ejemplos, los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí pueden mostrar deleciones en el dominio Gla endógeno, o sustituciones en las posiciones que normalmente están gamma-carboxiladas. Alternativamente, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos para introducir sitios de gamma-carboxilación potenciales adicionales.

Las siguientes secciones describen ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en la técnica para lograr una mayor estabilidad y/o actividad coagulante de un polipéptido FIX. Como se discutió anteriormente, tales modificaciones también pueden incluirse adicionalmente en cualquier polipéptido FIX modificado provisto aquí. Las posiciones de aminoácidos a las que se hace referencia a continuación corresponden al polipéptido FIX maduro como se establece en la SEQ ID NO: 3. Se pueden hacer mutaciones correspondientes en otros polipéptidos FIX, tales como variantes alélicas, de especies o de empalme del polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3.

a. Modificaciones para aumentar la actividad.

En un ejemplo, se pueden hacer modificaciones adicionales a un polipéptido de factor IX modificado proporcionado aquí que da como resultado una mayor actividad catalítica hacia el factor X. Por ejemplo, se pueden hacer modificaciones a los aminoácidos que están involucrados en la interacción con su cofactor, FVIIIa, de modo que el polipéptido FIX modificado resultante tiene una mayor afinidad por el FVIIIa y, por lo tanto, muestra una mayor actividad hacia FX en condiciones en las que el FVIIIa no se está saturando. También se pueden hacer modificaciones en FIX que aumentan la eficiencia catalítica de los polipéptidos FIXa y/o el complejo FIXa/FVIIIa, en comparación con la actividad del polipéptido FIXa no modificado o el complejo FIXa/FVIIIa, para la activación del sustrato FX.

Los ejemplos de modificaciones adicionales que pueden incluirse en los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí para aumentar la actividad intrínseca del polipéptido FIX modificado incluyen, pero no están limitados a, los descritos en Hopfner et al., (1997) EMBO J. 16: 6626-6635; Kolkman et al., (2000) Biochem. 39: 7398-7405; Sichler et al., (2003) J. Biol. Chem 278: 4121-4126; Begbie et al., (2005) Thromb. Haemost 94 (6): 1138-47; La Patente de Estados Unidos No. 6531298 y las Publicaciones de Patente de Estados Unidos No. 20080167219 y 20080214461. Los ejemplos no limitantes de modificaciones de aminoácidos ejemplares descritas en la técnica que pueden dar como resultado una mayor actividad intrínseca del polipéptido FIX modificado incluyen uno o más de V86A, V86N, V86D, V86E, V86Q, V86G, V86H, V86I, V86L, V86M, V86F, V86S, V86T, V86W, V86Y, Y259F, A261K, K265T, E277V, E277A, E277N, E277D, E277Q, E277G, E277H, E277I, E277L, E277M, E277F, E277S, E277T, E277W, E277Y, R338A, R338V, R338I, R338F, R338W, R338S, R338T, Y345F, I383V, E388G. Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado proporcionado en este documento puede contener las sustituciones de aminoácidos Y259F/K265T, Y259F/K265T/Y345F, Y259F/A261K/K265T/Y345F, Y259F/K265T/Y345F/I383V/E388G o Y259F/A261K/K265T/Y345F/I383V/E388G. En otro ejemplo, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden contener modificaciones que eliminan el péptido de activación (Δ155-177) (véase, por ejemplo, Begbie et al., (2005) Thromb. Haemost. 94 (6): 1138-47), que pueden aumentar la actividad y disminuir la depuración in vivo.

b. Modificaciones que aumentan la afinidad por los fosfolípidos o reducen la unión al colágeno

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí también pueden contener una o más modificaciones adicionales para aumentar la afinidad por los fosfolípidos. La actividad coagulante de FIX puede potenciarse aumentando la unión y/o afinidad del polipéptido por fosfolípidos, como los expresados en la superficie de las plaquetas activadas. Esto se puede lograr, por ejemplo, modificando el dominio endógeno FIX Gla. La modificación se puede efectuar mediante la sustitución de aminoácidos en una o más posiciones en el dominio Gla de un polipéptido FIX que da como resultado un polipéptido FIX modificado con una mayor capacidad para unir fosfatidilserina y otros fosfolípidos cargados negativamente. Los ejemplos de modificaciones adicionales para aumentar la unión y/o afinidad de fosfolípidos y que se pueden hacer a un polipéptido FIX modificado proporcionado en este documento, incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 6,017,882. Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado proporcionado en el presente documento puede contener una o más modificaciones en las posiciones de aminoácidos 11, 12, 29, 33 y/o 34 (correspondientes a un polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3). Ejemplos de tales modificaciones son las sustituciones de aminoácidos K5I, K5L, K5F, K5E, Q11E, Q11D, R16E, R29F y/o N34E, N34D, N34F, N34I, N34L, T35D y T35E.

En otro aspecto, los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí también pueden contener una o más modificaciones adicionales para reducir la afinidad por el colágeno. La actividad coagulante de FIX se puede mejorar reduciendo la unión y/o afinidad del polipéptido por el colágeno IV, que está presente en la superficie de la matriz extracelular en las células endoteliales. Una unión reducida al colágeno IV puede dar como resultado una mayor circulación de los polipéptidos FIX modificados y, por lo tanto, una mayor actividad coagulante in vivo. Esto se puede lograr, por ejemplo, modificando el dominio FIX Gla en los residuos de aminoácidos 3 a 11 de un polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3, que son responsables de la interacción con el colágeno IV (Cheung et al., (1992) J. Biol. Chem. 267: 20529-20531; Cheung et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11068-11073). La modificación puede efectuarse mediante sustitución de aminoácidos en una o más posiciones en el dominio Gla de un polipéptido FIX que da como resultado un polipéptido FIX modificado con capacidad disminuida para unirse al colágeno IV. Los ejemplos de modificaciones adicionales para aumentar la unión y/o afinidad de fosfolípidos y que se pueden hacer a un polipéptido FIX modificado proporcionado en este documento, incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Schuettrumpf et al., (2005) Blood 105(6): 2316-23; Melton et al., (2001) Blood Coagul. Fibrinólisis 12(4): 237-43; y Cheung et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 93: 11068-11073. Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado proporcionado aquí puede contener sustituciones de aminoácidos K5A y/o V10K.

C. Modificaciones adicionales para aumentar la resistencia a los inhibidores.

Se pueden incluir modificaciones adicionales que aumentan la actividad del polipéptido FIX al aumentar la resistencia del polipéptido FIX modificado a los inhibidores, tales como, por ejemplo, la inhibición por antitrombina III (AT-III)/heparina. Típicamente, esto se puede lograr modificando uno o más residuos que están involucrados en la interacción con AT-III, heparina o el complejo AT-III/heparina. Ejemplos de tales modificaciones incluyen las descritas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 7,125,841; Pat. Pub. De los EE. UU. No. 20040110675; Pat. Pub. Int. No. WO2002040544; Chang, J. et al., (1998) J. Biol. Chem. 273 (20): 12089-94; Yang, L. et al., (2002) J. Biol. Chem. 277 (52): 50756-60; Yang, L. et al, (2003) J. Biol. Chem. 278(27): 25032-8; Rohlena et al., (2003) J. Biol. Chem. 278(11): 9394-401; Sheehan et al., (2006) Blood 107(10): 3876-82; Buyue et al. (2008) Blood 112: 3234-3241. Los ejemplos no limitantes de modificaciones que se pueden incluir para disminuir la inhibición por AT-III y/o heparina, incluyen, pero no se limitan a, modificaciones en las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos R252, H256, H257, K265, H268, K293, R318, R333, R338, K400, R403, K409 o K411 de un polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, los polipéptidos FIX proporcionados aquí pueden contener las sustituciones de aminoácidos R252A, H257A, H268A, K293A, R318A, R333A, R338A, K400A, R403A, R403E y/o K411A.

d. Modificaciones adicionales para alterar la glucosilación

Las modificaciones, además de las descritas anteriormente, pueden incorporarse en los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento para alterar la glucosilación de los polipéptidos FIX modificados en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Por ejemplo, los polipéptidos FIX modificados pueden contener una o más modificaciones que introducen uno o más sitios de glucosilación no nativos en el polipéptido FIX modificado. Por lo tanto, cuando se expresa en un sistema apropiado, los polipéptidos FIX modificados pueden exhibir patrones de glucosilación alterados en comparación con un polipéptido FIX no modificado. En algunos ejemplos, los polipéptidos FIX modificados exhiben un aumento de la glucosilación en comparación con un polipéptido FIX no modificado, como un aumento de la N-glucosilación o un aumento de la O-glucosilación

Los ejemplos de modificaciones adicionales que pueden incluirse en los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento para alterar el perfil de glucosilación de un polipéptido FIX incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las solicitudes publicadas internacionales Nos. WO2009130198, WO2009051717 y WO2009137254. Las modificaciones ejemplares que se pueden incluir en un polipéptido FIX modificado proporcionado aquí para aumentar la glucosilación incluyen, pero no se limitan a, YIN, YIN + S3T, S3N + K5S/T, G4T, G4N + L6S/T, K5N + E7T, L6N + E8T, E7N + F9T, F9N +Q11S/T, V10N+G12S/T, Q11N + N13T, G12N + L14S/T, L14N + R16T, E15T, E15N + E17T; R16N +C18S/T, M19N + E21T; E20N + K22T, K22N, S24N + E26T; F25N + E27T; E26N + A28T; E27N + R29T; A28N + E30T; R29N+V31S/T, E30N + F32T; V31N + E33T; F32N + N34T, E33N, T35N + R37S/T, E36T; E36N; R37N, T39N + F41S/T, E40N + W42T, F41N + K43S/T, W42N +Q44S/T, K43N + Y45T; Q44N+V46S/T, Y45N + D47T, V46N +G48S/T, D47N + D49S/T, G48N +Q50S/T, D49N +C51S/T, Q50N + E52S/T, E52N + N54T, S53N + P55S/T, C56S/T, L57N+G59S/T, G59N + S61T; G60S/T, S61N + K63S/T, K63N + D65S/T, D65N + N67S/T, I66N + S68S/T, Y69S/T, Y69N +C71S/T, S68N + E70S/T, E70N+W72S/T, W72N + P74S/T, P74N+G76S/T, F75N, G76N + E78T, E78N + K80T, F77T, F77N+G79S/T, G79N + N81S/T, K80N+C82S/T, E83S/T, E83N + D85S/T, L84N+V86S/T, D85N, V86A, V86N +C88S/T, T87N+N89S/T, I90N + N92S/T, K91S/T, I90N + N92S/T, K91N+G93S/T, R94S/T, R94N+E96S/T, K100N, A103S/T, S102N + D104S/T, A103N + N105S/T, D104N + K106S/T, V107S/T, K106N+V108S/T, V108N+V110S/T, S111N, E113N+Y115S/T, G114N + R116S/T, R116N+A118S/T, E119N +Q121S/T, K122S/T, Q121N + S123S/T, K122N+C124S/T S123N + E125S/T, E125N+A125S/T, P126N+V128S/T, A127N + P129T, V128N + F130S/T, P129N + P131S/T, F130N+C132S/T, R134N, V135N+V137S/T, S136N, S138N, V137N + Q139T; Q139N, T140N + L142S/T, S141N + L143S/T, K142N, A146N+A148S/T, E147N+V149S/T, T148N+ F150S/T, V149N + P151S/T, F150N + D152S/T, P151N+V153S/T, D152N + D154S/T, V153N+Y155S/T, D154N+V156S/T, Y155N + N157S/T, V156N, S158N + E160S/T, T159N+A161S/T, E160N + E162S/T, A161N, E162N +I164S/T, T163N + L165S/T, I164N + D166S/T, L165N + N167S/T, D166N + I168S/T, I168N+Q170S/T, T169N, Q170N, S171N +Q173S/T, T172N, Q173N + F175S/T, S174N + N176S/T, F175N + D177S/T, F178S/T, D177N, D177E, F178N + R180S/T, T179N+V181S/T, R180N+V182S/T, G183 + E185S/T, G184N + D186T, E185N+A187S/T, D186N + K188S/T, A187N + P189T, K188N+G190S/T, P189N +Q181S/T, G200N + V202T, K201N + D203S/T, K201T, V202N+A204S/T, D203N + F205S/T, E213N +W215S/T, K214T, V223T, E224N+G226S/T, T225N+V227S/T, G226N + K228S/T, V227N + I229T, K228N, H236N + I238T; I238N + E240T; E239N, E240N + E242S/T, E242N, T241N + H243S/T, H243N + E245S/T, K247N + N249S/T, V250N + R252T, I251S/T, I251N + I253S/T, R252N + I254S/T, I253N + P255S/T, P255N + H257S/T, H257N+Y259S/T, N260S/T, A262S/T, A261N + I263S/T, A262N + N264S/T, I263N + K265S/T, K265N + N267S/T, A266N + H268S/T, D276N + P278S/T, P278N+V280S/T, E277N + L279S/T, V280N + N282S/T, Y284S/T, S283N+V285S/T, Y284N, D292N + K294S/T, K293N+Y295S/T, E294N, F299S/T, I298N + L300S/T, K301N+G303S/T, F302N, G303N +G305S/T, S304N+Y306S/T, Y306N +S308S/T, R312N + F314S/T, V313N + H315T, F314N + K316S/T, H315N +G317S/T, K316N + R138S/T, G317N, S319N + L321S/T, A320N + V322T, L321N + L323S/T, V322N+Q324S/T, Y325N + R327S/T, R327N + P329S/T, P329N+V331S/T, L330N + D332S/T, D332N+A334S/T, R333N, A334N+C336S/T, T335N + L337S/T, L337N, R338N, S339N + K341T, T340N + F342T; K341N, F342N + I344S/T, T343N+Y345S/T, Y345N + N347S/T, M348S/T, G352N + H354T, F353N, F353N + E355T, H354N +G356S/T, H354V, H354I, E355T, E355N+G357S/T, G356N + R358T, G357N + D359S/T, R358N, Q362N + D364S/T, V370N; T371V; T371I; E372T, E372N + E374S/T, E374N, G375N, W385N + E387T; G386N + E388T, E388N+A390S/T, A390N + K392T, M391N+G393S/T, K392N + K394S/T, K392V, G393T, G393N+Y395S/T, K394N+G396S/T, R403N+V405S/T, I408S/T, K409N + K411S/T, E410N, K411N + K413S/T, y K413N.

e. Modificaciones para aumentar la resistencia a las proteasas.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento también pueden contener modificaciones adicionales que dan como resultado una mayor resistencia del polipéptido a las proteasas. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos que eliminen uno o más sitios potenciales de división proteolítica. De este modo, los polipéptidos FIX modificados pueden hacerse más resistentes a las proteasas, aumentando así la estabilidad y la vida media del polipéptido modificado.

Los ejemplos de modificaciones adicionales que pueden incluirse en los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento para aumentar la resistencia a las proteasas incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la publicación de patente de EE.UU. No. 20080102115 y la solicitud internacional publicada No. WO2007149406. Las modificaciones ejemplares que se pueden incluir en un polipéptido FIX modificado proporcionado aquí para aumentar la resistencia a la proteasa incluyen, pero no se limitan a, Y1H, Y1I, S3Q, S3H, S3N, G4Q, G4H, G4N, K5N, K5Q, L6I, L6V, E7Q, E7H, E7N, E8Q, E8H, E8N, F9I, F9V, V10Q, V10H, V10N, G12Q, G12H, G12N, L14I, L14V, E15Q, E15H, E15N, R16H, R16Q, E17Q, E17H, E17N, M19I, M19V, E20Q, E20H, E20N, E21Q, E21H, E21N, K22N, K22Q, S24Q,

S24H, S24N, F25I, F25V, E26Q, E26H, E26N, E27Q, E27H, E27N, A28Q, A28H, A28N, R29H, R29Q, E30Q, E30H, E30N, V31Q, V31H, V31N, F32I, F32V, E33Q, E33H, E33N, T35Q, T35H, T35N, E36Q, E36H, E36N, R37H, R37Q, T38Q, T38H, T38N, T39Q, T39H, T39N, E40Q, E40H, E40N, F41I, F41V, W42S, W42H, K43N, K43Q, Y45H, Y45I, V46Q, V46H, V46N, D47N, D47Q, G48Q, G48H, G48N, D49N, D49Q, E52Q, E52H, E52N, S53Q, S53H, S53N, P55A, P55S, L57I, L57V, N58Q, N58S, G59Q, G59H, G59N, G60Q, G60H, G60N, S61Q, S61H, S61N, K63N, K63Q, D64N, D64Q, D65N, D65Q, I66Q, I66H, I66N, S68Q, S68H, S68N, Y69H, Y69I, E70Q, E70H, E70N, W72S, W72H, P74A, P74S, F75I, F75V, G76Q, G76H, G76N, F77I, F77V, E78Q, E78H, E78N, G79Q, G79H, G79N, K80N, K80Q, E83Q, E83H, E83N, L84I, L84V, D85N, D85Q, V86Q, V86H, V86N, T87Q, T87H, T87N, I90Q, I90H, I90N, K91N, K91Q, N92Q, N92S, G93Q, G93H, G93N, R94H, R94Q, E96Q, E96H, E96N, F98I, F98V, K100N, K100Q, S102Q, S102H, S102N, A103Q, A103H, A103N, D104N, D104Q, K106N, K106Q, V107Q, V107H, V107N, V108Q, V108H, V108N, S110Q, S110H, S110N, T112Q, T112H, T112N, E113Q, E113H, E113N, G114Q, G114H, G114N, Y115H, Y115I, R116H, R116Q, L117I, L117V, A118Q, A118H, A118N, E119Q, E119H, E119N, K122N, K122Q, S123Q, S123H, S123N, E125Q, E125H, E125N, P126A, P126S, A127Q, A127H, A127N, V128Q, V128H, V128N, P129A, P129S, P131A, P131S, G133Q, G133H, G133N, R134H, R134Q, V135Q, V135H, V135N, S136Q, S136H, S136N, V137Q, V137H, V137N, S138Q, S138H, S138N, T140Q, T140H, T140N, S141Q, S141H, S141N, K142N, K142Q, L143I, L143V, T144Q, T144H, T144N, R145H, R145Q, A146Q, A146H, A146N, E147Q, E147H, E147N, T148Q, T148H, T148N, V149Q, V149H, V149N, P151A, P151S, D152N, D152Q, V153Q, V153H, V153N, D154N, D154Q, Y155H, Y155I, V156Q, V156H, V156N, S158Q, S158H, S158N, T159Q, T159H, T159N, E160Q, E160H, E160N, A161Q, A161H, A161N, E162Q, E162H, E162N, T163Q, T163H, T163N, I164Q, I164H, I164N, L165I, L165V, L165Q, L165H, D166N, D166Q, I168Q, I168H, I168N, T169Q, T169H, T169N, S171Q, S171H, S171N, T172Q, T172H, T172N, S174Q, S174H, S174N, F175I, F175V, F175H, D177N, D177Q, F178I, F178V, F178H, T179Q, T179H, T179N, R180H, R180Q, V181Q, V181H, V181N, V182Q, V182H, V182N, G183Q, G183H, G183N, G184Q, G184H, G184N, E185Q, E185H, E185N, D186N, D186Q, A187Q, A187H, A187N, K188N, K188Q, P189A, P189S, G190Q, G190H, G190N, F192I, F192V, F192IH, P193A, P193S, W194S, W194H, W194I, V196Q, V196H, V196N, V197Q, V197H, V197N, L198I, L198V, L198Q, L198H, N199Q, N199S, G200Q, G200H, G200N, K201N, K201Q, V202Q, V202H, V202N, D203N, D203Q, A204Q, A204H, A204N, F205I, F205V, G207Q, G207H, G207N, G208Q, G208H, G208N, S209Q, S209H, S209N, I210Q, I210H, I210N, V211Q, V211H, V211N, E213Q, E213H, E213N, K214N, K214Q, W215S, W215H, I216Q, I216H, I216N, V217Q, V217H, V217N, T218Q, T218H, T218N, A219Q, A219H, A219N, A220Q, A220H, A220N, V223Q, V223H, V223N, E224Q, E224H, E224N, T225Q, T225H, T225N, G226Q, G226H, G226N, V227Q, V227H, V227N, K228N, K228Q, I229Q, I229H, I229N, T230Q, T230H, T230N, V231Q, V231H, V231N, V232Q, V232H, V232N, A233Q, A233H, A233N, G234Q, G234H, G234N, E235Q, E235H, E235N, I238Q, I238H, I238N, E239Q, E239H, E239N, E240Q, E240H, E240N, T241Q, T241H, T241N, E242Q, E242H, E242N, T244Q, T244H, T244N, E245Q, E245H, E245N, K247N, K247Q, R248H, R248Q, V250Q, V250H, V250N, 1251Q, I251H, 1251N, R252H, R252Q, I253Q, I253H, I253N, I254Q, I254H, I254N, P255A, P255S, Y259H, Y259I, A261Q, A261H, A261N, A262Q, A262H, A262N, I263Q, I263H, I263N, K265N, K265Q, Y266H, Y266I, D269N, D269Q, I270Q, I270H, I270N, A271Q, A271H, A271N, L272I, L272V, L273I, L273V, E274Q, E274H, E274N, L275I, L275V, D276N, D276Q, E277Q, E277H, E277N, P278A, P278S, L279I, L279V, V280Q, V280H, V280N, L281I, L281V, S283Q, S283H, S283N, Y284H, Y284I, V285Q, V285H, V285N, T286Q, T286H, T286N, P287A, P287S, I288Q, I288H, I288N, I290Q, I290H, I290N, A291Q, A291H, A291N, D292N, D292Q, K293N, K293Q, E294Q, E294H, E294N, Y295H, Y295I, T296Q, T296H, T296N, I298Q, I298H, I298N, F299I, F299V, L300I, L300V, K301N, K301Q, F302I, F302V, G303Q, G303H, G303N, S304Q, S304H, S304N, G305Q, G305H, G305N, Y306H, Y306I, V307Q, V307H, V307N, S308Q, S308H, S308N, G309Q, G309H, G309N, W310S, W310H, G311Q, G311H, G311N, R312H, R312Q, V313Q, V313H, V313N, F314I, F314V, K316N, K316Q, G317Q, G317H, G317N, S319Q, S319H, S319N, A320Q, A320H, A320N, L321I, L321V, V322Q, V322H, V322N, L323I, L323V, Y325H, Y325I, L326I, L326V, R327H, R327Q, V328Q, V328H, V328N, P329A, P329S, L330I, L330V, V331Q, V331H, V331N, D332N, D332Q, R333H, R333Q, A334Q, A334H, A334N, T335Q, T335H, T335N, L337I, L337V, R338H, R338Q, S339Q, S339H, S339N, T340Q, T340H, T340N, K341N, K341Q, F342I, F342V, T343Q, T343H, T343N, I344Q, I344H, I344N, Y345H, Y345I, M348I, M348V, F349I, F349V, A351Q, A351H, A351N, G352Q, G352H, G352N, F353I, F353V, E355Q, E355H, E355N, G356Q, G356H, G356N, G357Q, G357H, G357N, R358H, R358Q, D359N, D359Q, S360Q, S360H, S360N, G363Q, G363H, G363N, D364N, D364Q, S365Q, S365H, S365N, G366Q, G366H, G366N, G367Q, G367H, G367N, P368A, P368S, V370Q, V370H, V370N, T371Q, T371H, T371N, E372Q, E372H, E372N, V373Q, V373H, V373N, E374Q, E374H, E374N, G375Q, G375H, G375N, T376Q, T376H, T376N, S377Q, S377H, S377N, F378I, F378V, L379I, L379V, T380Q, T380H, T380N, G381Q, G381H, G381N, I382Q, I382H, I382N, I383Q, I383H, I383N, S384Q, S384H, S384N, W385S, W385H, G386Q, G386H, G386N, E387Q, E387H, E387N, E388Q, E388H, E388N, A390Q, A390H, A390N, M391I, M391V, K392N, K392Q, G393Q, G393H, G393N, K394N, K394Q, Y395H, Y395I, G396Q, G396H, G396N, I397Q, I397H, I397N, Y398H, Y398I, T399Q, T399H, T399N, K400N, K400Q, V401Q, V401H, V401N, S402Q, S402H, S402N, R403H, R403Q, Y404H, Y404I, V405Q, V405H, V405N, W407S, W407H, I408Q, I408H, I408N, K409N, K409Q, E410Q, E410H, E410N, K411N, K411Q, T412Q, T412H, T412N, K413N, K413Q, L414I, L414V, T415Q, T415H, y T415N (numeración correspondiente al polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3).

f. Modificaciones para reducir la inmunogenicidad.

Las modificaciones adicionales a un polipéptido FIX modificado proporcionado en el presente documento pueden incluir modificaciones de al menos un residuo de aminoácido que da como resultado una reducción sustancial en la actividad o eliminación de uno o más epítopos de células T de la proteína, es decir, la desinmunización del polipéptido. Una o más modificaciones de aminoácidos en posiciones particulares dentro de cualquiera de los ligandos de MHC de clase II pueden dar como resultado un polipéptido FIX desinmunizado con inmunogenicidad reducida cuando se administra

como terapéutico a un sujeto, como, por ejemplo, un sujeto humano. Por ejemplo, una cualquiera o más modificaciones divulgadas en la publicación de patente de EE.UU. No. 20040254106 pueden incluirse en el polipéptido FIX modificado proporcionado en este documento para reducir la inmunogenicidad.

Las modificaciones de aminoácidos ejemplares que pueden contribuir a la inmunogenicidad reducida de un polipéptido FIX incluyen una o más modificaciones de aminoácidos correspondientes a una o más de las siguientes modificaciones: Y1A, Y1C, Y1D, Y1E, Y1G, Y1H, Y1K, Y1N, Y1P, Y1Q, Y1R, Y1S, Y1T, S3T, L6A, L6C, L6D, L6E, L6G, L6H, L6K, L6N, L6P, L6Q, L6R, L6S, L6T, L6M, F9A, F9C, F9D, F9E, F9G, F9H, F9K, F9N, F9P, F9Q, F9R, F9S, F9T, F9I, F9M, F9W, V10A, V10C, V10D, V10E, V10G, V10H, V10K, V10N, V10P, V10Q, V10R, V10S, V10T, V10F, V10I, V10M, V10W, V10Y, Q11A, Q11C, Q11G, Q11P, G12D, G12E, G12G, G12H, G12K, G12N, G12P, G12Q, G12R, G12S, G12T, N13A, N13C, N13G, N13H, N13P, N13T, L14A, L14C, L14D, L14E, L14G, L14H, L14K, L14N, L14P, L14Q, L14R, L14S, L14T, L14F, L14I, L14M, L14V, L14W, L14Y, E15D, E15H, E15P, R16A, R16C, R16G, R16P, R16T, E17A, E17C, E17G, E17P, E17T, C18D, C18E, C18G, C18H, C18K, C18N, C18P, C18Q, C18R, C18S, C18T, M19A, M19C, M19D, M19E, M19G, M19H, M19K, M19N, M19P, M19Q, M19R, M19S, M19T, M19F, M19I, M19M, M19V, M19W, M19Y, E20A, E20C, E20G, E20P, E20T, E21A, E21C, E21G, E21P, K22H, K22P, K22T, S24H, S24P, F25A, F25C, F25D, F25E, F25G, F25H, F25K, F25N, F25P, F25Q, F25R, F25S, F25T, F25I, F25M, F25W, F25Y, E26A, E26C, E26G, E26P, E27A, E27C, E27G, E27H, E27P, E27S, E27T, A28C, A28D, A28E, A28G, A28H, A28K, A28N, A28P, A28Q, A28R, A28S, A28T, R29A, R29C, R29G, R29P, E30D, E30H, E30P, V31A, V31C, V31D, V31E, V31G, V31H, V31K, V31N, V31P, V31Q, V31R, V31S, V31T, V31F, V31I, V31W, V31Y, F32A, F32C, F32D, F32E, F32G, F32H, F32K, F32N, F32P, F32Q, F32R, F32S, F32T, E33H, E33N, E33P, E33Q, E33S, E33T, T35A, T35C, T35G, T35P, F41A, F41C, F41D, F41E, F41G, F41H, F41K, F41N, F41P, F41Q, F41R, F41S, F41T, F41M, F41W, F41Y, W42A, W42C, W42D, W42E, W42G, W42H, W42K, W42N, W42P, W42Q, W42R, W42S, W42T, K43A, K43C, K43G, K43P, Q44P, Q44T, Q44, Y45A, Y45C, Y45D, Y45E, Y45G, Y45H, Y45K, Y45N, Y45P, Y45Q, Y45R, Y45S, Y45T, V46A, V46C, V46D, V46E, V46G, V46H, V46K, V46N, V46P, V46Q, V46R, V46S, V46T, V46F, V46I, V46M, V46W, V46Y, D47A, D47C, D47G, D47H, D47P, D47T, G48D, G48E, G48P, G48T, D49H, D49P, D49Q, D49T, Q50A, Q50C, Q50D, Q50G, Q50H, Q50P, Q50T, C51D, C51E, C51G, C51H, C51K, C51N, C51P, C51Q, C51R, C51S, C51T, E52P, E52T, S53A, S53C, S53G, S53H, S53P, S53T, N54H, N54P, N54T, L57A, L57C, L57D, L57E, L57G, L57H, L57K, L57N, L57P, L57Q, L57R, L57S, L57T, L57F, L57I, L57M, L57W, L57Y, G60C, G60D, G60H, G60P, G60T, C62D, C62H, C62P, K63T, D65H, D65T, I66A, I66C, I66D, I66E, 166G, I66H, I66K, I66N, I66P, I66Q, I66R, I66S, I66T, I66M, 166W, I66Y, Y69A, Y69C, Y69D, Y69E, Y69G, Y69H, Y69K, Y69N, Y69P, Y69Q, Y69R, Y69S, Y69T, C71H, C71P, W72A, W72C, W72D, W72E, W72G, W72H, W72K, W72N, W72P, W72Q, W72R, W72S, W72T, W72I, W72Y, F75A, F75C, F75D, F75E, F75G, F75H, F75K, F75N, F75P, F75Q, F75R, F75S, F75T, F77A, F77C, F77D, F77E, F77G, F77H, F77K, F77N, F77P, F77Q, F77R, F77S, F77T, L84A, L84C, L84D, L84E, L84G, L84H, L84K, L84N, L84P, L84Q, L84R, L84S, L84T, L84M, L84W, L84Y, V86A, V86C, V86D, V86E, V86G, V86H, V86K, V86N, V86P, V86Q, V86R, V86S, V86T, I90A, I90C, I90D, I90E, I90G, I90H, I90K, I90N, I90P, I90Q, I90R, I90S, I90T, I90M, I90W, K91A, K91C, K9IG, K91P, N92A, N92C, N92G, N92P, N92T, G93D, G93E, G93H, G93K, G93N, G93P, G93Q, G93R, G93S, G93T, R94A, R94C, R94G, R94P, C95D, C95E, C95G, C95H, C95K, C95N, C95P, C95Q, C95R, C95S, C95T, E96P, E96T, Q97A, Q97C, Q97G, Q97P, F98A, F98C, F98D, F98E, F98G, F98H, F98K, F98N, F98P, F98Q, F98R, F98S, F98T, F98M, F98W, F98Y, K100A, K100C, K100G, K100P, N101H, N101T, A103D, A103E, A103H, A103K, A103N, A103P, A103Q, A103R, A103S, A103T, D104T, K106H, K106P, K106T, V107A, V107C, V107D, V107E, V107G, V107H, V107K, V107N, V107P, V107Q, V107R, V107S, V107T, V108A, V108C, V108D, V108E, V108G, V108H, V108K, V108N, V108P, V108Q, V108R, V108S, V108T, V108F, V108M, V108W, V108Y, S110A, S110C, S110G, S110P, C111D, C111E, C111H, C111K, C111N, C111P, C111Q, C111R, C111S, C111T, T112A, T112C, T112G, T112P, E113D, E113H, E113P, G114D, G114E, G114H, G114K, G114N, G114P, G114Q, G114R, G114S, G114T, Y115A, Y115C, Y115D, Y115E, Y115G, Y115H, Y115K, Y115N, Y115P, Y115Q, Y115R, Y115S, Y115T, Y115M, Y115W, R116P, R116T, L117A, L117C, L117D, L1 17E, L1 17G, L117H, L117K, LII7N, L117P, L117Q, L1 17R, L117S, L117T, A118D, A118E, A118H, A118K, A118N, A118P, A118Q, A118R, A118S, A118T, N120D, N120H, N120P, Q121T, S123H, S123T, V128A, V128C, V128D, V128E, V128G, V128H, V128K, V128N, V128P, V128Q, V128R, V128S, V128T, F130A, F130C, F130D, F130E, F130G, F130H, F130K, F130N, F130P, F130Q, F130R, F130S, F130T, V135A, V135C, V135D, V135E, V135G, V135H, V135K, V135N, V135P, V135Q, V135R, V135S, V135T, V135W, V135Y, V137A, V137C, V137D, V137E, V137G, V137H, V137K, V137N, V137P, V137Q, V137R, V137S, V137T, V137M, V137W, V137Y, S138H, S138T, T140D, T140H, S141T, K142H, K142P, L143A, L143C, L143D, L143E, L143G, L143H, L143K, L143N, L143P, L143Q, L143R, L143S, L143T, L143F, L143I, L143M, L143V, L143W, L143Y, R145H, R145P, R145T, A146P, A146T, T148H, T148P, V149A, V149C, V149D, V149E, V149G, V149H, V149K, V149N, V149P, V149Q, V149R, V149S, V149T, V149F, V149I, V149M, V149W, V149Y, F150A, F150C, F150D, F150E, F150G, F150H, F150K, F150N, F150P, F150Q, F150R, F150S, F150T, F150M, F150W, F150Y, D152A, D152C, D152G, D152P, D152S, D152T, V153A, V153C, V153D, V153E, V153G, V153H, V153K, V153N, V153P, V153Q, V153R, V153S, V153T, V153F, V153I, V153M, V153W, V153Y, D154A, D154C, D154G, D154P, D154Q, D154S, Y155A, Y155C, Y155D, Y155E, Y155G, Y155H, Y155K, Y155N, Y155P, Y155Q, Y155R, Y155S, Y155T, Y155M, Y155V, Y155W, V156A, V156C, V156D, V156E, V156G, V156H, V156K, V156N, V156P, V156Q, V156R, V156S, V156T, V156I, V156M, V156W, V156Y, N157A, N157C, N157G, N157H, N157P, N157Q, N157T, S158H, S158P, S158T, T159A, T159C, T159G, T159P, E160A, E160C, E160G, E160P, A161C, A161D, A161E, A161H, A161K, A161N, A161P, A161Q, A161R, A161S, A161T, E162P, E162T, T163A, T163C, T163G, T163P, 1164A, I164C, I164D, I164E, I164G, I164H, I164K, I164N, I164P, I164Q, I164R, I164S, I164T, L165A, L165C, L165D, L165E, L165G, L165H, L165K, L165N, L165P, L165Q, L165R, L165S, L165T, L165M, L165W, L165Y, I168A, I168C, I168D, I168E, I168G, I168H, I168K, I168N, I168P, I168Q, I168R, I168S, I168T, F175A, F175C, F175D, F175E, F175G, F175H, F175K, F175N, F175P, F175Q, F175R, F175S, F175T, F178A, F178C, F178D, F178E, F178G, F178H, F178K, F178N, F178P,

F178Q, F178R, F178S, F178T, F178M, F178W, F178Y, T179A, T179C, T179G, T179P, R180A, R180C, R180D, R180G, R180H, R180P, V181A, V181C, V181D, V181E, V181G, V181H, V181K, V181N, V181P, V181Q, V181R, V181S, V181T, V181F, V181I, V181M, V181W, V181Y, V182A, V182C, V182D, V182E, V182G, V182H, V182K, V182N, V182P, V182Q, V182R, V182S, V182T, V182F, V182I, V182M, V182W, V182Y, G183D, G183E, G183H, G183K, G183N, G183P, G183Q, G183S, G183T, G184D, G184E, G184H, G184K, G184N, G184P, G184Q, G184R, G184S, G184T, E185A, E185C, E185G, E185H, E185P, E185T, D186A, D186C, D186G, D186H, D186P, D186T, A187C, A187D, A187E, A187G, A187H, A187K, A187N, A187P, A187Q, A187R, A187S, A187T, K188A, K188C, K188G, K188H, K188P, K188T, G190D, G190E, G190H, G190K, G190N, G190P, G190Q, G190R, G190S, G190T, F192A, F192C, F192D, F192E, F192G, F192H, F192K, F192N, F192P, F192Q, F192R, F192S, F192T, F192W, F192Y, W194A, W194C, W194D, W194E, W194G, W194H, W194K, W194N, W194P, W194Q, W194R, W194S, W194T, Q195H, Q195P, Q195T, V196A, V196C, V196D, V196E, V196G, V196H, V196K, V196N, V196P, V196Q, V196R, V196S, V196T, V196F, V196I, V196M, V196W, V196Y, V197A, V197C, V197D, V197E, V197G, V197H, V197K, V197N, V197P, V197Q, V197R, V197S, V197T, V197F, V197I, V197M, V197W, V197Y, L198A, L198C, L198D, L198E, L198G, L198H, L198K, L198N, L198P, L198Q, L198R, L198S, L198T, L198I, L198Y, N199A, N199C, N199G, N199H, N199P, N199S, N199T, G200P, G200T, K201A, K201C, K201D, K201E, K201G, K201H, K201N, K201P, K201Q, K201S, K201T, V202A, V202C, V202D, V202E, V202G, V202H, V202K, V202N, V202P, V202Q, V202R, V202S, V202T, V202F, V202I, V202M, V202W, V202Y,D203A, D203C, D203G, D203P, D203T, A204C, A204D, A204E, A204G, A204H, A204K, A204N, A204P, A204Q, A204R, A204S, A204T, F205A, F205C, F205D, F205E, F205G, F205H, F205K, F205N, F205P, F205Q, F205R, F205S, F205T, F205M, F205V, F205W, F205Y, G207H, G207P, G208C, G208D, G208E, G208H, G208K, G208N, G208P, G208Q, G208R, G208S, G208T, S209A, S209C, S209G, S209P, I210A, I210C, I210D, I210E, I210G, I210H, I210K, I210N, I210P, I210Q, I210R, I210S, I210T, I210F, I210W, I210Y, V211A, V211C, V211D, V211E, V211G, V211H, V211K, V211N, V211P, V211Q, V211R, V211S, V211T, V211F, V211I, V211M, V211W, N212A, N212C, N212G, N212P, E213H, E213P, E213S, E213T, K214T, W215A, W215C, W215D, W215E, W215G, W215H, W215K, W215N, W215P, W215Q, W215R, W215S, W215T, I216A, I216C, I216D, I216E, I216G, I216H, I216K, I216N, I216P, I216Q, I216R, I216S, I216T, V217A, V217C, V217D, V217E, V217G, V217H, V217K, V217N, V217P, V217Q, V217R, V217S, V217T, V217I, V217Y, A219H, A219P, A219T, V223A, V223C, V223D, V223E, V223G, V223H, V223K, V223N, V223P, V223Q, V223R, V223S, V223T, V223M, V223W, V223Y, G226P, V227A, V227C, V227D, V227E, V227G, V227H, V227K, V227N, V227P, V227Q, V227R, V227S, V227T, V227F, V227I, V227M, V227W, V227Y, K228A, K228C, K228G, K228H, K228P, I229A, I229C, I229D, I229E, I229G, I229H, I229K, I229N, I229P, I229Q, I229R, I229S, I229T, I229M, I229W, I229Y, T230A, T230C, T230G, T230P, V231A, V231C, V231D, V231E, V231G, V231H, V231K, V231N, V231P, V231Q, V231R, V231S, V231T, V232A, V232C, V232D, V232E, V232G, V232H, V232K, V232N, V232P, V232Q, V232R, V232S, V232T, V232F, V232I, V232M, V232W, V232Y, A233C, A233D, A233E, A233G, A233H, A233K, A233N, A233P, A233Q, A233R, A233S, A233T, A233V, G234D, G234E, G234H, G234K, G234N, G234P, G234Q, G234R, G234S, G234T, E235H, E235N, E235P, E235Q, E235S, E235T, H236A, H236C, H236G, H236P, N237A, N237C, N237G, N237P, N237T, I238A, I238C, I238D, I238E, I238G, I238H, I238K, I238N, I238P, I238Q, I238R, I238S, I238T, E239A, E239C, E239G, E239P, E240H, E240T, V250A, V250C, V250D, V250E, V250G, V250H, V250K, V250N, V250P, V250Q, V250R, V250S, V250T, V250M, V250W, V250Y, I251A, I251C, I251D, I251E, 1251G, I251H, I251K, I251N, I251P, I251Q, I251R, I251S, I251T, I253A, I253C, I253D, I253E, I253G, I253H, I253K, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253M, I253W, I253Y, I254A, I254C, I254D, I254E, I254G, I254H, I254K, I254N, I254P, I254Q, I254R, I254S, I254T, P255H, H256P, H256T, H257A, H257C, H257G, H257P, N258P, N258T, Y259A, Y259C, Y259D, Y259E, Y259G, Y259H, Y259K, Y259N, Y259P, Y259Q, Y259R, Y259S, Y259T, Y259M, Y259W, N260A, N260C, N260G, N260P, A261D, A261E, A261H, A261K, A261N, A261P, A261Q, A261R, A261S, A261T, A262C, A262D, A262E, A262G, A262H, A262K, A262N, A262P, A262Q, A262R, A262S, A262T, I263A, I263C, I263D, I263E, I263G, I263H, I263K, I263N, I263P, I263Q, I263R, 1263S, I263T, I263M, 1263V, I263W, I263Y, N264A, N264C, N264D, N264G, N264H, N264P, K265A, K265C, K265G, K265H, K265P, Y266A, Y266C, Y266D, Y266E, Y266G, Y266H, Y266K, Y266N, Y266P, Y266Q, Y266R, Y266S, Y266T, Y266M, Y266W, N267A, N267C, N267G, N267H, N267P, N267T, H268P, D269A, D269C, D269E, D269G, D269H, D269N, D269P, D269Q, D269S, D269T, I270A, I270C, I270D, I270E, I270G, I270H, I270K, I270N, I270P, I270Q, I270R, I270S, I270T, I270M, I270W, A271C, A271D, A271E, A271G, A271H, A271K, A271N, A271P, A271Q, A271R, A271S, A271T, L272A, L272C, L272D, L272E, L272G, L272H, L272K, L272N, L272P, L272Q, L272R, L272S, L272T, L272F, L273A, L273C, L273D, L273E, L273G, L273H, L273K, L273N, L273P, L273Q, L273R, L273S, L273T, L273F, L273I, L273M, L273V, L273W, L273Y, E274A, E274C, E274G, E274P, E274T, L275A, L275C, L275D, L275E, L275G, L275H, L275K, L275N, L275P, L275Q, L275R, L275S, L275T, L275W, L275Y, D276P, D276S, D276T, E277A, E277C, E277G, E277P, P278T, L279A, L279C, L279D, L279E, L279G, L279H, L279K, L279N, L279P, L279Q, L279R, L279S, L279T, L279I, L279Y, V280A, V280C, V280D, V280E, V280G, V280H, V280K, V280N, V280P, V280Q, V280R, V280S, V280T, V280F, V280I, V280W, V280Y, L281A, L281C, L281D, L281E, L281G, L281H, L281K, L281N, L281P, L281Q, L281R, L281S, L281T, L281F, L281I, L281V, L281W, L281Y, S283A, S283C, S283G, S283P, Y284A, Y284C, Y284D, Y284E, Y284G, Y284H, Y284K, Y284N, Y284P, Y284Q, Y284R, Y284S, Y284T, Y284M, V285A, V285C, V285D, V285E, V285G, V285H, V285K, V285N, V285P, V285Q, V285R, V285S, V285T, V285M, V285W, V285Y, T286A, T286C, T286G, T286P, I288A, I288C, I288D, I288E, I288G, I288H, I288K, I288N, I288P, I288Q, I288R, I288S, I288T, C289D, C289H, C289P, I290A, I290C, I290D, I290E, I290G, I290H, I290K, I290N, I290P, I290Q, I290R, I290S, I290T, I290Y, A291D, A291E, A291H, A291K, A291N, A291P, A291Q, A291R, A291S, A291T, D292A, D292C, D292G, D292P, D292T, K293H, K293P, K293T, Y295A, Y295C, Y295D, Y295E, Y295G, Y295H, Y295K, Y295N, Y295P, Y295Q, Y295R, Y295S, Y295T, Y295W, T296A, T296C, T296G, T296P, N297A, N297C, N297G, N297P, I298A, I298C, I298D, I298E, I298G, I298H, I298K, I298N, I298P, I298Q, I298R, I298S, I298T, F299A, F299C, F299D, F299E, F299G, F299H, F299K, F299N, F299P, F299Q, F299R, F299S, F299T, L300A, L300C, L300D, L300E, L300G, L300H, L300K, L300N, L300P, L300Q, L300R, L300S, L300T, L300F, L300I,

L300M, L300V, L300W, L300Y, K301A, K301C, K301G, K301P, K301T, F302A, F302C, F302D, F302E, F302G, F302H, F302K, F302N, F302P, F302Q, F302R, F302S, F302T, G303H, G303P, G303T, S304A, S304C, S304G, S304P, S304T, G305D, G305E, G305H, G305N, G305P, G305Q, G305S, G305T, Y306A, Y306C, Y306D, Y306E, Y306G, Y306H, Y306K, Y306N, Y306P, Y306Q, Y306R, Y306S, Y306T, V307A, V307C, V307D, V307E, V307G, V307H, V307K, V307N, V307P, V307Q, V307R, V307S, V307T, S308P, S308T, W310A, W310C, W310D, W310E, W310G, W310H, W310K, W310N, W310P, W310Q, W310R, W310S, W310T, G311H, V313A, V313C, V313D, V313E, V313G, V313H, V313K, V313N, V313P, V313Q, V313R, V313S, V313T, F314A, F314C, F314D, F314E, F314G, F314H, F314K, F314N, F314P, F314Q, F314R, F314S, F314T, F314M, F314W, F314Y, H315A, H315C, H315G, H315P, K316A, K316C, K316G, K316P, G317C, G317D, G317E, G317H, G317K, G317N, G317P, G317Q, G317R, G317S, G317T, S319D, S319H, S319N, S319P, S319Q, A320C, A320D, A320E, A320G, A320H, A320K, A320N, A320P, A320Q, A320R, A320S, A320T, L321A, L321C, L321D, L321E, L321G, L321H, L321K, L321N, L321P, L321Q, L321R, L321S, L321T, V322A, V322C, V322D, V322E, V322G, V322H, V322K, V322N, V322P, V322Q, V322R, V322S, V322T, V322W, V322Y, L323A, L323C, L323D, L323E, L323G, L323H, L323K, L323N, L323P, L323Q, L323R, L323S, L323T, L323F, L323I, L323M, L323V, L323W, L323Y, Q324A, Q324C, Q324G, Q324P, Y325A, Y325C, Y325D, Y325E, Y325G, Y325H, Y325K, Y325N, Y325P, Y325Q, Y325R, Y325S, Y325T, Y325W, L326A, L326C, L326D, L326E, L326G, L326H, L326K, L326N, L326P, L326Q, L326R, L326S, L326T, L326F, L326I, L326M, L326V, L326W, L326Y, R327A, R327C, R327G, R327H, R327P, V328A, V328C, V328D, V328E, V328G, V328H, V328K, V328N, V328P, V328Q, V328R, V328S, V328T, V328F, V328I, V328M, V328W, V328Y, L330A, L330C, L330D, L330E, L330G, L330H, L330K, L330N, L330P, L330Q, L330R, L330S, L330T, L330F, L330I, L330V, L330W, L330Y, V331A, V331C, V331D, V331E, V331G, V331H, V331K, V331N, V331P, V331Q, V331R, V331S, V331T, V331F, V331I, V331M, V331W, V331Y, D332A, D332C, D332G, D332P, R333A, R333C, R333D, R333E, R333G, R333H, R333N, R333P, R333Q, R333R, R333S, R333T, A334C, A334D, A334E, A334G, A334H, A334K, A334N, A334P, A334Q, A334R, A334S, A334T, T335A, T335C, T335G, T335P, C336D, C336E, C336H, C336K, C336N, C336P, C336Q, C336R, C336S, C336T, L337A, L337C, L337D, L337E, L337G, L337H, L337K, L337N, L337P, L337Q, L337R, L337S, L337T, R338A, R338C, R338G, R338P, S339P, S339T, K341A, K341C, K341G, K341P, F342A, F342C, F342D, F342E, F342G, F342H, F342K, F342N, F342P, F342Q, F342R, F342S, F342T, F342M, F342W, T343A, T343C, T343G, T343P, I344A, I344C, I344D, I344E, I344G, I344H, I344K, I344N, I344P, I344Q, I344R, I344S, I344T, Y345A, Y345C, Y345D, Y345E, Y345G, Y345H, Y345K, Y345N, Y345P, Y345Q, Y345R, Y345S, Y345T, Y345M, Y345W, N346A, N346C, N346G, N346P, N347H, N347P, M348A, M348C, M348D, M348E, M348G, M348H, M348K, M348N, M348P, M348Q, M348R, M348S, M348T, F349A, F349C, F349D, F349E, F349G, F349H, F349K, F349N, F349P, F349Q, F349R, F349S, F349T, F349I, F349M, F349W, F349Y, C350D, C350H, C350P, C350T, A351E, A351H, A351N, A351P, A351Q, A351R, A351S, A351T, G352A, G352C, G352P, F353A, F353C, F353D, F353E, F353G, F353H, F353K, F353N, F353P, F353Q, F353R, F353S, F353T, F353I, F353M, F353W, H354A, H354C, H354G, H354P, E355A, E355C, E355D, E355G, E355H, E355K, E355N, E355P, E355Q, E355S, E355T, G356D, G356E, G356H, G356K, G356N, G356P, G356Q, G356R, G356S, G356T, G357D, G357E, G357H, G357K, G357N, G357P, G357Q, G357R, G357S, G357T, R358D, R358E, R358H, R358K, R358N, R358P, R358Q, R358R, R358S, R358T, D359A, D359C, D359G, D359P, D359Q, D359S, D359T, S360A, S360C, S360G, S360P, C361D, C361E, C361H, C361K, C361N, C361P, C361Q, C361R, C361S, C361T, V370A, V370C, V370D, V370E, V370G, V370H, V370K, V370N, V370P, V370Q, V370R, V370S, V370T, V370W, V370Y, V373A, V373C, V373D, V373E, V373G, V373H, V373K, V373N, V373P, V373Q, V373R, V373S, V373T, V373F, V373I, V373M, V373W, E374A, E374C, E374G, E374P, G375H, S377A, S377C, S377G, S377P, F378A, F378C, F378D, F378E, F378G, F378H, F378K, F378N, F378P, F378Q, F378R, F378S, F378T, F378W, L379A, L379C, L379D, L379E, L379G, L379H, L379K, L379N, L379P, L379Q, L379R, L379S, L379T, L379I, L379M, L379W, L379Y, T380A, T380C, T380G, T380P, G381D, G381E, G381H, G381K, G381N, G381P, G381Q, G381R, G381S, G381T, I382A, I382C, I382D, I382E, I382G, I382H, I382K, I382N, I382P, I382Q, I382R, I382S, I382T, I382M, I382W, I382Y, I383A, I383C, I383D, I383E, I383G, I383H, I383K, I383N, I383P, I383Q, I383R, I383S, I383T, S384A, S384C, S384G, S384P, W385A, W385C, W385D, W385E, W385G, W385H, W385K, W385N, W385P, W385Q, W385R, W385S, W385T, W385M, E387A, E387C, E387G, E387H, E387P, E387T, E388H, E388N, E388P, E388Q, E388T, A390C, A390D, A390E, A390G, A390H, A390K, A390N, A390P, A390Q, A390R, A390S, M391A, M391C, M391D, M391E, M391G, M391H, M391K, M391N, M391P, M391Q, M391R, M391S, M391T, M391F, M391I, M391W, M391Y, K392A, K392C, K392G, K392P, G393C, G393D, G393E, G393H, G393K, G393N, G393P, G393Q, G393R, G393S, G393T, Y395A, Y395C, Y395D, Y395E, Y395G, Y395H, Y395K, Y395N, Y395P, Y395Q, Y395R, Y395S, Y395T, Y398A, Y398C, Y398D, Y398E, Y398G, Y398H, Y398K, Y398N, Y398P, Y398Q, Y398R, Y398S, Y398T, K400H, V401A, V401C, V401D, V401E, V401G, V401H, V401K, V401N, V401P, V401Q, V401R, V401S, V401T, V401F, V401I, V401M, V401W, V401Y, S402A, S402C, S402G, S402P, R403A, R403C, R403G, R403P, R403T, Y404A, Y404C, Y404D, Y404E, Y404G, Y404H, Y404K, Y404N, Y404P, Y404Q, Y404R, Y404S, Y404T, V405A, V405C, V405D, V405E, V405G, V405H, V405K, V405N, V405P, V405Q, V405R, V405S, V405T, V405W, V405Y, N406F, N406H, N406I, N406L, N406P, N406W, N406Y, W407D, W407E, W407F, W407H, W407I, W407K, W407N, W407P, W407Q, W407R, W407S, W407T, W407Y, I408D, I408E, I408H, I408K, I408N, I408P, I408Q, I408R, I408S, I408T, K409F, K409H, K409I, K409P, K409T, K409V, K409W, K409Y, E410H, K411A, K411C, K411G, K411I, K411P, K411T, K411V, K411W, K411Y o K413T, con numeracióncorrespondiente a un polipéptido FIX maduro establecido en la SEQ ID NO: 3.

g. Modificaciones de combinación ejemplares

En este documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados que tienen dos o más modificaciones diseñadas para afectar una o más propiedades o actividades de un polipéptido FIX no modificado. En algunos ejemplos, las dos o más modificaciones alteran dos o más propiedades o actividades del polipéptido FIX. Las modificaciones se pueden realizar

en los polipéptidos FIX de modo que uno o más de glucosilación, resistencia a AT-III, resistencia a AT-III/heparina, resistencia a heparina, actividad catalítica, unión a LRP, actividad intrínseca, unión a fosfolípidos y/o afinidad, la resistencia a las proteasas, la vida media y la interacción con otros factores o moléculas, como FVIIIa y FX se alteren. Típicamente, las dos o más modificaciones se combinan de manera que el polipéptido FIX modificado resultante tenga una actividad coagulante aumentada, una mayor duración de la actividad coagulante y/ o un índice terapéutico mejorado en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Las modificaciones pueden incluir la sustitución, inserción o deleción de aminoácidos. El aumento de la actividad coagulante, el aumento de la duración de la actividad coagulante y/o un índice terapéutico mejorado del polipéptido FIX modificado que contiene dos o más modificaciones se puede aumentar al menos o al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 300%, 400%, 500% o más en comparación con la actividad del polipéptido FIXa inicial o no modificado.

En este documento se proporcionan polipéptidos FIX modificados que contienen dos o más modificaciones que se introducen en un polipéptido FIX no modificado para alterar una, dos o más actividades o propiedades. Los polipéptidos FIX modificados pueden contener 2, 3, 4, 5, 6 o más modificaciones. Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado proporcionado en este documento puede contener las modificaciones para aumentar la glucosilación mediante la incorporación de un sitio de glucosilación no nativo en la secuencia primaria, como las sustituciones de aminoácidos D203N y F205T para introducir un sitio de glucosilación no nativo en la posición 203, y una modificación para aumentar la resistencia a AT-III/heparina, tal como R338E (residuos que corresponden a un polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3).

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí pueden tener dos o más modificaciones seleccionadas únicamente de las establecidas en las Tablas 3-9. En otros ejemplos, el polipéptido FIX modificado contiene dos o más modificaciones donde se seleccionan una o más modificaciones de las establecidas en las Tablas 3-9 y una o más modificaciones son modificaciones adicionales que no se establecen en las Tablas 3-9, tales como, por ejemplo, modificaciones descritas en la técnica. En algunos ejemplos, la una o más modificaciones adicionales se pueden seleccionar de las establecidas en la Sección D.3.a-f, anterior, como las que dan como resultado una mayor actividad catalítica, mayor resistencia a los inhibidores, mayor afinidad y/o unión a plaquetas y fosfolípidos, aumento de la resistencia a la proteasa, disminución de la inmunogenicidad y aquellos que facilitan la conjugación con fracciones, tales como fracciones de PEG.

En la Tabla 10 se proporcionan modificaciones de combinación ejemplares no limitativas. Estas modificaciones de combinación ejemplares incluyen dos o más modificaciones que están diseñadas para alterar dos o más actividades o propiedades de un polipéptido FIX, que incluyen, pero no se limitan a, mayor resistencia a AT-III, mayor resistencia a AT-III/heparina, mayor resistencia a la heparina, mayor actividad catalítica y glucosilación alterada. Los polipéptidos FIX modificados que contienen tales modificaciones de combinación pueden tener una actividad coagulante aumentada, una mayor duración de la actividad coagulante y/o un índice terapéutico mejorado. En la Tabla 10 a continuación, se identifica el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se establecen ejemplos de secuencias de aminoácidos del polipéptido FIX modificado.

Tabla 10.

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
R318Y/E410N	R150Y/E240N	153
R338E/E410N	R170E/E240N	154
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	155
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	157
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	158
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	159
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	160
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	161
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	162
K228N/E410N	K63N/E240N	163
K228N/R338E	K63N/R170E	164
K228N/R33 8A	K63N/R170A	165
K228N/R318Y	K63N/R150Y	166
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	167
R403E/E410N	R233E/E240N	168
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	169
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	170

ES 2 782 078 T3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	171
R318Y/R338E/R403E/E4 10N	R150Y/R170E/R233E/E240N	172
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	173
F314N/K316S	F145N/K148S	177
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	217
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	218
K228N/I251S	K63N/I86S	180
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	181
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	182
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	219
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	220
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	221
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	222
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	223
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	224
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	225
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	226
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	178

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
D104N/K106S/K247N/M249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	179
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	183
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	227
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	228
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	229
Y155F/I251S	Y[155]F/186S	230
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	231
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	232
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	233
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403 E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	234
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R 170E/R233E/E240N	235
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	236
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	237
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	238
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	239
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	240
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	241
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	242

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	243
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	244
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	245
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	246
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	247
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	248
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	184
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	249
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	250
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	251
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	252
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	253
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	254
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	255
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	256
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	257
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	258
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	259

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	260
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	261
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	262
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	263
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	264
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	265
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	266
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	267
R338E/T343R	R170E/T175R	268
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[1041N/K[106]S/Y[155]F/N95S	269
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	270
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	271
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/ N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	272
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	185
T343R/Y345T	T175R/Y177T	215
R318Y/R338E	R150Y/R170E	188
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	216

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
D1 04N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155] F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	326
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	327
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	328
Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	329
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	330
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	331
T343R/N346Y	T175R/N178Y	332
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/E240N	333
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	334
T343R/N346D	T175R/N178D	335
R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/E240N	336
R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	337
R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/N178D/R233E/E240N	338
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	339
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/R1701E/R233E	340
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	341
K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	342

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	343
K247N/N249S/R33 8E/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	344
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	345
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E	346
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	347
Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/E240N	348
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	349
Y]55F/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E/E240N	350
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	351
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	352
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	353
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	354
K228N/1251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	355
Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	356
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	357
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	358
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	359
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	360

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	361
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	362
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	363
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	364
Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	365
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R1R233E/E240S	366
Y155F/K247N[N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	367
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	368
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	369
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	370
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	371
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	372
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R	Y[155]F/K82N[N84S/R150Y/T175R	373
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E	Y[1551F/K82N/N84S/R150Y/R233E	374
Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/E240N	375
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	376
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	377
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	378

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	379
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R R233E/E240N	380
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	381
Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/E240N	382
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	383
K247N/N249S/R318Y/343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	384
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	385
K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	386
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	387
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	388
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	389
K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	390
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	391
K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	392
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	393
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	394
Y155F/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E	395
Y155F/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/T175R/R233E/E240N	396

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	397
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	398
Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240N	399
Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R233E/E240N	400
Y155F/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/E240N	401
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	402
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	403
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	404
K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	405
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K63N/K82N/N84S/R1 50Y/R170E/T175R/R233E	406
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	407
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	408
Y155F/R338E/R403E/E410N	Y[1 55]F/R170E/R233E/E240N	409
Y155F/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E	410
Y155F/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R233E/E240N	411

3. Conjugados y proteínas de fusión

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden conjugarse o fusionarse con otro polipéptido u otra fracción, tal como un polímero. En algunos casos, la conjugación o fusión se efectúa para aumentar la vida útil en suero. Los polipéptidos ejemplares a los que se pueden fusionar los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, albúmina sérica, Fc, FcRn y transferrina (véase, por ejemplo, Sheffield, WP et al, (2004) Br. J. Haematol. 126 (4): 565-73; Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20050147618; Publicaciones de Patentes Internacionales No. WO2007112005 y WO2004101740).

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden conjugarse con un polímero, tal como dextrano, un polietilenglicol (pegilación (PEG)) o fracción sialílica, u otros polímeros, tales como polímeros naturales o de azúcar. En un ejemplo, los polipéptidos se conjugan con dextranos, como se describe en otra parte (Zambaux et al., (1998) J. Protein Chem. 17 (3): 279-84). En la técnica se conocen varios métodos para modificar polipéptidos mediante la unión covalente (conjugación) de un PEG o derivado de PEG (es decir, “PEGilación” (véanse, por ejemplo, US20060104968, US5672662, US6737505 y US 20040235734). Las técnicas para la PEGilación incluyen, pero no se limitan a, enlazadores especializados y químicas de acoplamiento (véase, por ejemplo, Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 459-476, 2002), la unión de múltiples restos PEG a un único sitio de conjugación (tales como mediante el uso de PEG ramificados; ver, por ejemplo, Veronese et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 12: 177-180, 2002), PEGilación y/o mono-PEGilación específica del sitio (ver, por ejemplo, Chapman et al., Nature Biotech. 17: 780-783, 1999), PEGilación enzimática dirigida al sitio (véase, por ejemplo, Sato, Adv. Drug Deliv. Rev., 54: 487-504, 2002), y glicoPEGilación (Publicaciones de Patentes de EE. UU. No. 20080050772, 20080146494, 20080050772, 20080187955 y 20080206808). Los métodos y técnicas descritos en la técnica pueden producir proteínas que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más derivados de PEG o PEG unidos a una sola molécula de proteína (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0104968) Por lo tanto, el polipéptido FIX modificado proporcionado aquí puede ser pegilado, incluido glicopegilado, usando cualquier método conocido en la técnica, tal como cualquiera descrito en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,969,040, 5,621,039, 6,423,826, las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos No., 20080050772, 20080146494, 20080050772, 20080187955 y 20080206808, Publicaciones de Patentes Internacionales No. WO2007112005, WO2007135182, WO2008082613, WO2008119815, WO2008119815.

En algunos casos, los polipéptidos FIX modificados incluyen reemplazos de aminoácidos para facilitar la conjugación a otra fracción. Por ejemplo, se pueden incorporar residuos de cisteína en el polipéptido FIX para facilitar la conjugación con polímeros. Las modificaciones de reemplazo de aminoácidos ejemplares para este propósito incluyen, pero no se limitan a, D47C, Q50C, S53C, L57C, I66C, N67C, S68C, E70C, W72C, P74C, K80C, L84C, V86C, N89C, I90C, K91C, R94C, K100C, N101C, S102C, A103C, D104C, N105C, K106C, V108C, E114C, R116C, E119C, N120C, Q121C, S123C, E125C, P129C, S138C, t140c, S141C, K142C, A146C, E147C, E162C, T163C, I164C, L165C, D166C, N167C, I168C, T169C, Q170C, S171C, T172C, Q173C, S174C, F175C, N176C, D177C, F178C, T179C, R180C, E185C, D186C, K188C, P189C, K201C, V202C, D203C, E224C, T225C, K228C, E239C, E240C, T241C, H243C, K247C, N249C, R252C, H257C, N260C, A261C, A262C, I263C, K265C, E277C, F314C, L321C, K341C, E372C, E374C, M391C, K392C, N406C, K413C y T415C. (correspondiente a un polipéptido FIX maduro expuesto en la SEQ ID NO: 3).

E. Producción de polipéptidos FIX

Los polipéptidos FIX, incluidos los polipéptidos FIX modificados, o dominios de los mismos, de FIX se pueden obtener mediante métodos bien conocidos en la técnica para la purificación de proteínas y la expresión de proteínas recombinantes. Se puede usar cualquier método conocido por los expertos en la técnica para la identificación de ácidos nucleicos que codifican genes deseados. Se puede usar cualquier método disponible en la técnica para obtener un clon de ADNc o ADN genómico de longitud completa (es decir que abarca toda la región de codificación), que codifica un polipéptido FIX u otro polipéptido de vitamina K, tal como de una fuente de células o tejidos, como por ejemplo del hígado. Los polipéptidos FIX modificados pueden diseñarse como se describe en el presente documento, tal como mediante mutagénesis dirigida al sitio.

FIX puede clonarse o aislarse usando cualquier método disponible conocido en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Dichos métodos incluyen la amplificación por PCR de ácidos nucleicos y la selección de bibliotecas, incluida la detección de hibridación de ácido nucleico, detección basada en anticuerpos y detección basada en actividad.

Los métodos para la amplificación de ácidos nucleicos se pueden usar para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido FIX, que incluyen, por ejemplo, métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se puede usar un material que contiene ácido nucleico como material de partida a partir del cual se puede aislar una molécula de ácido nucleico que codifica FIX. Por ejemplo, las preparaciones de ADN y ARNm, extractos celulares, extractos de tejidos (por ejemplo, del hígado), muestras de fluidos (por ejemplo, sangre, suero, saliva), muestras de sujetos sanos y/o enfermos pueden usarse en métodos de amplificación. Las bibliotecas de ácido nucleico también se pueden usar como fuente de material de partida. Los cebadores pueden diseñarse para amplificar una molécula que codifica FIX. Por ejemplo, los cebadores pueden diseñarse en base a secuencias expresadas a partir de las cuales se genera un FIX. Los cebadores pueden diseñarse en base a la traducción inversa de una secuencia de aminoácidos FIX. Las moléculas de ácido nucleico generadas por amplificación pueden secuenciarse y confirmarse para codificar un polipéptido FIX.

Se pueden unir secuencias de nucleótidos adicionales a una molécula de ácido nucleico que codifica FIX, incluyendo secuencias enlazadoras que contienen sitios de endonucleasa de restricción con el fin de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteínas o un vector diseñado para el amplificación de la proteína del núcleo que codifica las secuencias de ADN. Además, las secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos funcionales de ADN pueden unirse operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica FIX. Los ejemplos de tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión intracelular de proteínas y secuencias de secreción diseñadas para facilitar la secreción de proteínas. Secuencias de nucleótidos adicionales tales como secuencias que especifican regiones de unión a proteínas también pueden unirse a moléculas de ácido nucleico que codifican FIX. Dichas regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias para facilitar la captación de FIX en células diana específicas, o de otro modo mejorar la farmacocinética del gen sintético.

Los ácidos nucleicos identificados y aislados se pueden insertar luego en un vector de clonación apropiado. Se puede usar una gran cantidad de sistemas vector-huésped conocidos en la técnica. Los posibles vectores incluyen, entre otros, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vectores debe ser compatible con la célula huésped utilizada. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como pBR322 o derivados de plásmidos pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). La inserción en un vector de clonación puede lograrse, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tenga terminales cohesivos complementarios. La inserción puede realizarse utilizando 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 modificarse enzimáticamente. Alternativamente, cualquier sitio deseado se puede producir ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) en los terminales del ADN; estos enlazadores ligados pueden contener oligonucleótidos sintetizados químicamente específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen de la proteína FIX pueden modificarse mediante colas homopoliméricas. Las moléculas recombinantes pueden introducirse en las células huésped mediante, por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se generan muchas copias de la secuencia génica.

En realizaciones específicas, la transformación de células huésped con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen de la proteína FIX aislada, el ADNc o la secuencia de ADN sintetizada permite la generación de múltiples copias del gen. Por lo tanto, el gen se puede obtener en grandes cantidades haciendo crecer transformantes, aislando las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperando el gen insertado del ADN recombinante aislado.

1. Vectores y células

Para la expresión recombinante de una o más de las proteínas FIX, el ácido nucleico que contiene toda o una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína FIX puede insertarse en un vector de expresión apropiado, *es decir,* un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación de proteínas insertada. Un ejemplo de dicho vector es cualquier vector de expresión de mamífero tal como, por ejemplo, pCMV. El promotor nativo también puede suministrar las señales de transcripción y traducción necesarias para los genes FIX y/o sus regiones flanqueantes.

También se proporcionan vectores que contienen ácido nucleico que codifica FIX o FIX modificado. También se proporcionan células que contienen los vectores. Las células incluyen células eucariotas y procariotas, y los vectores son adecuados para su uso.

Se proporcionan células eucariotas y procariotas, incluidas las células endoteliales, que contienen los vectores. Dichas células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, Archea, células vegetales, células de insectos y células animales. Las células se usan para producir un polipéptido FIX o un polipéptido FIX modificado del mismo haciendo crecer las células descritas anteriormente en condiciones por las cuales la proteína FIX codificada es expresada por la célula y recuperando la proteína FIX expresada. Para los fines de este documento, el FIX puede secretarse al medio.

En una realización, se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad FIX y contiene todo o una porción del polipéptido FIX, o copias múltiples del mismo. Los vectores se pueden seleccionar para la expresión del polipéptido FIX o el polipéptido FIX modificado del mismo en la célula o de tal manera que la proteína FIX se exprese como una proteína secretada. Cuando se expresa el FIX, el ácido nucleico se liga al ácido nucleico que codifica una señal de secreción, tal como la secuencia de señal del factor α acoplamiento de *Saccharomyces cerevisiae* de o una porción de la misma, o la secuencia de señal nativa.

Se puede usar una variedad de sistemas huésped-vector para expresar la secuencia de codificación de proteínas. Estos incluyen sistemas de células de mamífero infectados con virus (por ejemplo, entre otros, virus vaccinia, adenovirus y otros virus); sistemas de células de insectos infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levadura que contiene vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico o ADN cósmido. Los elementos de expresión de los vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiendo del

sistema huésped-vector utilizado, se puede usar cualquiera de una serie de elementos de transcripción y traducción adecuados.

Cualquier método conocido por los expertos en la técnica para la inserción de fragmentos de ADN en un vector puede usarse para construir vectores de expresión que contienen un gen quimérico que contiene señales de control transcripcional/traduccional apropiadas y secuencias de codificación de proteínas. Estos métodos pueden incluir ADN recombinante *in vitro* y técnicas sintéticas y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido FIX o un polipéptido FIX modificado, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos, pueden regularse mediante una segunda secuencia de ácido nucleico para que los genes o fragmentos del mismo se expresen en un huésped transformado con las moléculas de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede ser controlada por cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En una realización específica, el promotor no es nativo de los genes para una proteína FIX. Los promotores que pueden usarse incluyen, entre otros, el promotor temprano SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290: 304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal 3' larga del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al. Cell 22: 787-797 (1980)), el promotor de herpes timidina quinasa (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster et al., Nature 296: 39-42 (1982)); vectores de expresión procariotas tales como el promotor de β-lactamasa (Jay et al, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 5543) o el promotor *tac* (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25 (1983)); ver también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American 242: 79-94 (1980)); vectores de expresión de plantas que contienen el promotor de nopalina sintetasa (Herrara-Estrella et al., Nature 303: 209-213 (1984)) o el promotor de ARN del virus del mosaico de la coliflor 35S (Garder et al, Nucleic Acids Res. 9: 2871 (1981)) y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bisfosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., Nature 310: 115-120 (1984)); elementos promotores de levadura y otros hongos como el promotor Gal4, el promotor de alcohol deshidrogenasa, el promotor de fosfoglicerol quinasa, el promotor de fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control de la transcripción animal que exhiben especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: gen elastasa I región de control que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., Cell 38: 639-646 (1984); Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7: 425-515 (1987)); región de control del gen de insulina que está activa en las células beta pancreáticas (Hanahan et al., Nature 315: 115-122 (1985)), región de control del gen de inmunoglobulina que está activa en las células linfoides (Grosschedl et al, Cell 38: 647-658 (1984); Adams et al., Nature 318: 533-538 (1985); Alexander et al., Mol. Cell Biol. 7: 1436-1444 (1987)), región de control de virus de tumor mamario de ratón que está activa en los mastocitos, células linfoides, testiculares y de mama, y (Leder et al., Cell 45: 485-495 (1986)), región de control de genes de albúmina que es activa en el hígado (Pinckert et al, Genes y Devel. 1: 268-276 (1987)), región de control del gen de alfafetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al., Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648 (1985); Hammer et al., Science 235: 53-58 1987), alfa-1 región de control del gen antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al, Genes and Devel. 1: 161-171 (1987)), región de control del gen de beta globina que es activa en las células mieloides (Magram et al., Nature 315: 338- 340 (1985); Kollias et al., Cell 46: 89-94 (1986)), región de control del gen de la proteína básica mielina que está activa en las células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead et al., Cell 48: 703-712 (1987)), región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina que está activa en el músculo esquelético (Shani, Nature 314 : 283-286 (1985)), y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotróficos que es activa en los gonadótrofos del hipotálamo (Mason et al., Science 234: 1372-1378 (1986)).

En una realización específica, se usa un vector que contiene un promotor operativamente unido a ácidos nucleicos que codifican un polipéptido FIX o polipéptido FIX modificado, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo del mismo, uno o más orígenes de replicación, y opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Los vectores y sistemas para la expresión de polipéptidos FIX incluyen los bien conocidos vectores *Pichia* (disponibles, por ejemplo, de Invitrogen, San Diego, CA), particularmente aquellos diseñados para la secreción de las proteínas codificadas. Los ejemplos de vectores plasmídicos para la expresión en células de mamífero incluyen, por ejemplo, pCMV. Los ejemplos de vectores plasmídicos para la transformación de células *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles en Qiagen, Valencia, CA; véase también la literatura publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor fago T5 (reconocido por la *E. coli* ARN polimerasa de) y un módulo de represión de operador doble lac para proporcionar una expresión de proteínas recombinantes, de alto nivel estrictamente reguladas, en *E. coli,* un sitio de unión ribosómica sintética (RBS II) para traducción eficiente, una secuencia de codificación de etiqueta 6XHis, terminadores transcripcionales t_0 y T1, origen de replicación ColE1 y un gen beta-lactamasa para conferir resistencia a la ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de una etiqueta 6xHis en el extremo N o C de la proteína recombinante. Tales plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30 y pQE 31 que proporcionan múltiples sitios de clonación para los tres marcos de lectura y proporcionan la expresión de proteínas marcadas con 6xHis N-terminalmente. Otros vectores plasmídicos ejemplares para la transformación de células *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, patente de los Estados Unidos 4,952,496; disponible de NOVAGEN, Madison, WI; véase, también, literatura publicada por Novagen que describe el sistema). Dichos plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T71ac, el terminador T7, el operador lac inducible de *E. coli* y el gen represor lac; pET 12a-c, que contiene el promotor T7, el terminador T7 y la señal de secreción ompT de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (NOVAGEN, Madison, WI), que contienen una secuencia líder His-Tag ™ para usar en la purificación con una columna His y un sitio de división de trombina que permite la división después de la purificación sobre la columna, la región promotora T7-lac y el terminador T7.

2. Sistemas de expresión

Los polipéptidos FIX (modificados y no modificados) pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica para la producción de proteínas, que incluyen métodos *in vitro* e *in vivo*, tales como, por ejemplo, la introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican FIX en un célula huésped, animal huésped y expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican FIX *in vitro.* Los polipéptidos FIX y FIX modificado pueden expresarse en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades y formas requeridas de un polipéptido FIX necesarios para la administración y el tratamiento. Los huéspedes de expresión incluyen organismos procariotes y eucariotas como *E. coli,* levadura, plantas, células de insectos, células de mamíferos, incluidas estirpes celulares humanas y animales transgénicos. Los huéspedes de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas, así como en los tipos de modificaciones postraduccionales que están presentes en las proteínas expresadas. La elección del huésped de expresión se puede hacer en función de estos y otros factores, como las consideraciones regulatorias y de seguridad, los costes de producción y la necesidad y los métodos de purificación.

La expresión en huéspedes eucariotas puede incluir expresión en levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris,* células de insecto tales como células de *Drosophila* y células de *lepidopteran*, plantas y células vegetales tales como tabaco, maíz, arroz, algas y lemna. Las células eucariotas para la expresión también incluyen líneas de células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón de hámster bebé (BHK). Los huéspedes de expresión eucariota también incluyen la producción en animales transgénicos, por ejemplo, incluida la producción en suero, leche y huevos. Los animales transgénicos para la producción de polipéptidos FIX de tipo silvestre son conocidos en la técnica (Publicaciones de Patentes de EE. UU. No. 2002-0166130 y 2004-0133930) y se pueden adaptar para la producción de polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento.

Muchos vectores de expresión están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica para la expresión de FIX. La elección del vector de expresión está influenciada por la elección del sistema de expresión del huésped. Dicha selección está dentro del nivel de habilidad del artesano experto. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores transcripcionales y opcionalmente potenciadores, señales traduccionales y señales de terminación transcripcional y traduccional. Los vectores de expresión que se usan para la transformación estable suelen tener un marcador seleccionable que permite la selección y el mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, se puede utilizar un origen de replicación para amplificar el número de copias de los vectores en las células.

Los polipéptidos FIX o FIX modificado también se pueden utilizar o expresar como fusiones de proteínas. Por ejemplo, se puede generar una fusión para agregar funcionalidad adicional a un polipéptido. Los ejemplos de proteínas de fusión incluyen, pero no se limitan a, fusiones de una secuencia señal, una etiqueta tal como para localización, por ejemplo, una etiqueta his_6 o una etiqueta myc, o una etiqueta para purificación, por ejemplo, una fusión GST y un secuencia para dirigir la secreción de proteínas y/o la asociación de membrana.

En una realización, el polipéptido FIX o los polipéptidos FIX modificados se pueden expresar en una forma activa, por lo que la activación se logra por incubación del factor XI activado por el polipéptido (FXIa) después de la secreción. En otra realización, la proteasa se expresa en una forma inactiva de zimógeno.

Los métodos de producción de polipéptidos FIX pueden incluir la coexpresión de uno o más polipéptidos heterólogos adicionales que pueden ayudar en la generación de los polipéptidos FIX. Por ejemplo, dichos polipéptidos pueden contribuir al procesamiento posterior a la traducción de los polipéptidos FIX. Los polipéptidos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, peptidasas que ayudan a escindir secuencias precursoras de FIX, como la secuencia de propéptido, y enzimas que participan en la modificación del polipéptido de FIX, como por glicosilación, hidroxilación, carboxilación o fosforilación, por ejemplo . Una peptidasa ejemplar que se puede coexpresar con FIX es PACE/furin (o PACE-SOL), que ayuda a la división de la secuencia de propéptido FIX. Una proteína ejemplar que ayuda en la carboxilación del polipéptido FIX es la enzima sensible a la warfarina vitamina K 2,3-epóxido reductasa (VKOR), que produce vitamina K reducida para su utilización como cofactor por la γ-carboxilasa dependiente de la vitamina K (Wajih et al., J. Biol. Chem. 280 (36) 31603-31607). Una subunidad de esta enzima, VKORC1, puede coexpresarse con el polipéptido FIX modificado para aumentar la γ-carboxilación. El uno o más polipéptidos adicionales pueden expresarse desde el mismo vector de expresión que el polipéptido FIX o desde un vector diferente.

a. Expresión procariota

Los procariotas, especialmente *E. coli,* proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de FIX *(véase,* por ejemplo, Platis et al. (2003) Protein Exp. Purif. 31(2): 222-30; y Khalilzadeh). et al. (2004) J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31(2): 63-69). La transformación de *E. coli* es una técnica simple y rápida bien conocida por los expertos en la materia. Los vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles que son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteínas y para expresar proteínas que exhiben cierta toxicidad para las células huésped. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor lac, el promotor trp, el promotor híbrido tac, los promotores de ARN T7 y SP6 y el promotor λP_L regulado por temperatura.

FIX puede expresarse en el entorno citoplasmático de *E. coli.* El citoplasma es un entorno reductor y para algunas moléculas, esto puede dar lugar a la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Se pueden usar agentes reductores como ditiotreitol y β-mercaptoetanol y desnaturalizantes (por ejemplo, Como guanidina-HCl y urea) para resolubilizar las

proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de FIX en el espacio periplásmico de las bacterias que proporciona un entorno oxidante y las isomerasas disulfuro de tipo chaperonina que conducen a la producción de proteínas solubles. Típicamente, una secuencia líder se fusiona con la proteína a expresar que dirige la proteína al periplasma. Luego, el líder se elimina mediante señales peptidasas dentro del periplasma. Los ejemplos de secuencias líder de direccionamiento periplásmico incluyen el líder pelB del gen de la pectato liasa y el líder derivado del gen de la fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la fuga de la proteína expresada en el medio de cultivo. La secreción de proteínas permite una purificación rápida y simple del sobrenadante del cultivo. Las proteínas que no son secretadas se pueden obtener del periplasma por lisis osmótica. Similar a la expresión citoplasmática, en algunos casos, las proteínas pueden volverse insolubles y pueden usarse agentes desnaturalizantes y reductores para facilitar la solubilización y el replegamiento. La temperatura de inducción y crecimiento también puede influir en los niveles de expresión y solubilidad. Típicamente, se usan temperaturas entre 25°C y 37°C. Las mutaciones también se pueden usar para aumentar la solubilidad de las proteínas expresadas. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por lo tanto, para la producción de los polipéptidos FIX hiperglicosilados proporcionados aquí, la glucosilación se puede agregar *in vitro* después de la purificación de las células huésped.

b. Levadura

Levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Yarrowia lipolytica, Kluyveromyces lactis,* y *Pichia pastoris* son los anfitriones de expresión útiles para FIX (véase, por ejemplo, Skoko et al. (2003) Biotechnol. Appl. Biochem. 38(PT3): 257-65). La levadura se puede transformar con vectores de replicación episómicos o mediante integración cromosómica estable mediante recombinación homóloga. Típicamente, los promotores inducibles se usan para regular la expresión génica. Los ejemplos de tales promotores incluyen GAL1, GAL7 y GAL5 y promotores de metalotioneína tales como CUP1. Los vectores de expresión a menudo incluyen un marcador seleccionable como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para la selección y mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levaduras a menudo son solubles y la coexpresión con chaperoninas, como Bip y la proteína disulfuro isomerasa, puede mejorar los niveles de expresión y la solubilidad. Además, las proteínas expresadas en la levadura pueden ser dirigidas para la secreción usando fusiones de péptidos con señal de secreción tales como la señal de secreción de factor alfa del tipo de acoplamiento de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de superficie celular de levadura tales como el receptor de adhesión de acoplamiento Aga2p o la *Arxula adeninivorans* glucoamilasa. Se puede diseñar un sitio de división de proteasa (por ejemplo, la proteasa Kex-2) para eliminar las secuencias fusionadas de los polipéptidos a medida que salen de la ruta de secreción. La levadura también es capaz de glicosilación en motivos Asn-X-Ser/Thr.

C. Insectos y células de insectos

Los insectos y las células de insecto, que particularmente utilizan un sistema de expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos tales como FIX o formas modificadas de los mismos *(*véase*,* por ejemplo, Muneta et al. (2003) J. Vet. Med. Sci. 65(2): 219-23). Las células de insectos y las larvas de insectos, incluida la expresión en la hemolinfa, expresan altos niveles de proteína y son capaces de la mayoría de las modificaciones postraduccionales utilizadas por eucariotas superiores. Los baculovirus tienen un rango de huéspedes restrictivo que mejora la seguridad y reduce las preocupaciones reguladoras de la expresión eucariota. Típicamente, los vectores de expresión usan un promotor tal como el promotor de polihedrina del baculovirus para la expresión de alto nivel. Los sistemas de baculovirus comúnmente utilizados incluyen baculovirus como el virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) y el virus de la polihedrosis nuclear *Bombyx mori* (BmNPV) y una estirpe celular de insectos como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda, Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para una expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula a expresar se fusiona inmediatamente corriente abajo del codón de iniciación de la polihedrina del virus. Las señales de secreción de mamíferos se procesan con precisión en células de insectos y se pueden usar para secretar la proteína expresada en el medio de cultivo. Además, las estirpes celulares *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glucosilación similares a los sistemas celulares de mamíferos.

Un sistema de expresión alternativo en células de insecto es el uso de células transformadas de forma estable. Las estirpes celulares como las células Schnieder 2 (S2) y Kc (*Drosophila melanogaster*) y las células C7 (*Aedes albopictus*) pueden usarse para la expresión. El promotor de metalotioneína Drosophila se puede usar para inducir altos niveles de expresión en presencia de inducción de metales pesados con cadmio o cobre. Los vectores de expresión se mantienen típicamente mediante el uso de marcadores seleccionables tales como neomicina e higromicina.

d. Células de mamíferos

Se pueden usar sistemas de expresión de mamífero para expresar polipéptidos FIX. Las construcciones de expresión pueden transferirse a células de mamífero por infección viral tal como adenovirus o por transferencia directa de ADN tal como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamíferos incluyen típicamente un sitio de tapa de ARNm, una caja TATA, una secuencia de iniciación traduccional (secuencia consenso de Kozak) y elementos de poliadenilación. Dichos vectores a menudo incluyen potenciadores del promotor transcripcional para la expresión de alto nivel, por ejemplo, el potenciador del promotor SV40, el promotor del citomegalovirus humano (CMV) y la repetición terminal larga del virus

del sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores potenciadores son activos en muchos tipos de células. Los promotores y las regiones potenciadoras de tejido y tipo celular también se pueden usar para la expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras ejemplares incluyen, pero no se limitan a, aquellas de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus de tumor mamario de ratón, albúmina, alfa-fetoproteína, alfa 1-antitripsina, beta-globina, proteína básica de mielina, cadena ligera-2 miosina y control génico de la hormona liberadora de gonadotrópicos. Los marcadores seleccionables se pueden usar para seleccionar y mantener celdas con la construcción de expresión. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no están limitados a, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforibosil transferasa, aminoglucósidos fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa y timidina quinasa. La fusión con moléculas de señalización de la superficie celular tales como TCR-ζ y FcεRI-γ puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo en la superficie celular.

Muchas estirpes celulares están disponibles para la expresión de mamíferos, incluyendo células de ratón, humano de rata, mono y pollo y hámster. Las estirpes celulares ejemplares incluyen, pero no se limitan a, BHK (es decir, células BHK-21), 293-F, CHO, CHO Express (CHOX; Excellgene), Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (sin secreción) y otras estirpes celulares de mieloma, estirpes celulares de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, células Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 293T, 2B8 y HKB. Las estirpes celulares también están disponibles adaptadas a medios sin suero que facilitan la purificación de proteínas secretadas a partir de los medios de cultivo celular. Un ejemplo de ello es la estirpe celular EBNA-1 libre de suero (Pham et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84: 332-42). La expresión de polipéptidos FIX recombinantes que exhiben una estructura similar y modificaciones postraduccionales como la FIX derivada de plasma se conoce en la técnica. Se conocen métodos para optimizar la expresión de proteínas dependientes de vitamina K. Por ejemplo, la suplementación de vitamina K en medio de cultivo o la coexpresión de γ-carboxilasas dependientes de vitamina K (Wajih et al., J. Biol. Chem. 280(36) 31603-31607) pueden ayudar en la modificación postraduccional de proteínas dependientes de vitamina K, como los polipéptidos FIX.

e. Plantas

Las células y plantas vegetales transgénicas pueden usarse para la expresión de FIX. Las construcciones de expresión se transfieren típicamente a plantas usando transferencia directa de ADN tal como bombardeo con microproyectiles y transferencia mediada por PEG en protoplastos, y con transformación mediada por agrobacterias. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias promotoras y potenciadoras, elementos de terminación de la transcripción y elementos de control de la traducción. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación generalmente se dividen entre huéspedes dicotiledóneas, como Arabidopsis y tabaco, y huéspedes monocotiledóneas, como maíz y arroz. Los ejemplos de promotores de plantas utilizados para la expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de la nopalina sintasa, el promotor de la ribosa bisfosfato carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. Los marcadores seleccionables como la higromicina, la fosfomanosa isomerasa y la neomicina fosfotransferasa a menudo se usan para facilitar la selección y el mantenimiento de las células transformadas. Las células vegetales transformadas pueden mantenerse en cultivo como células, agregados (tejido calloso) o regenerarse en plantas enteras. Debido a que las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación que las células de mamíferos, esto puede influir en la elección de producir FIX en estos huéspedes. Las células de plantas transgénicas también pueden incluir algas diseñadas para producir proteínas *(véase,* por ejemplo, Mayfield et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100: 438-442). Debido a que las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación que las células de mamíferos, esto puede influir en la elección de producir FIX en estos huéspedes.

2. Purificación

Los métodos para la purificación de polipéptidos FIX a partir de células huésped dependen de las células huésped y los sistemas de expresión elegidos. Para las moléculas secretadas, las proteínas generalmente se purifican de los medios de cultivo después de eliminar las células. Para la expresión intracelular, las células se pueden lisar y las proteínas se pueden purificar del extracto. Cuando los organismos transgénicos, como las plantas y los animales transgénicos, se usan para la expresión, los tejidos u órganos se pueden usar como material de partida para hacer un extracto celular lisado. Además, la producción animal transgénica puede incluir la producción de polipéptidos en la leche o los huevos, que pueden recogerse, y si es necesario, las proteínas pueden extraerse y purificarse adicionalmente usando métodos estándar en la técnica.

FIX se puede purificar usando técnicas de purificación de proteínas estándar conocidas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, SDS-PAGE, fracción de tamaño y cromatografía de exclusión de tamaño, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de quelato y cromatografía de intercambio iónico. Por ejemplo, los polipéptidos FIX se pueden purificar por cromatografía de intercambio aniónico, como se describe en el Ejemplo 1, a continuación. Un ejemplo de un método para purificar polipéptidos FIX es mediante el uso de una columna de intercambio iónico que permite la unión de cualquier polipéptido que tenga un dominio Gla funcional, seguido de elución en presencia de calcio. Las técnicas de purificación por afinidad también se pueden utilizar para mejorar la eficiencia y la pureza de las preparaciones. Por ejemplo, los anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen a FIX pueden usarse en la purificación por afinidad. Las construcciones de expresión también se pueden diseñar para agregar una etiqueta de afinidad, como un epítopo myc, fusión GST o His_6 y purificación por afinidad con anticuerpo myc, resina de glutatión y resina de Ni, respectivamente, a una proteína. La pureza puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluida la electroforesis en gel y las técnicas de tinción y espectrofotometría.

El polipéptido FIX se puede expresar y purificar para estar en una forma inactiva (forma de zimógeno) o, como alternativa, la proteasa expresada se puede purificar en una forma activa, tal como por autocatálisis. Por ejemplo, los polipéptidos FIX que se han activado mediante división proteolítica después de R145 y R180 pueden prepararse *in vitro* (es decir, FIXa; forma de dos cadenas). Los polipéptidos FIX pueden prepararse primero por cualquiera de los métodos de producción descritos en este documento, que incluyen, pero no se limitan a, producción en células de mamífero seguido de purificación. La división de los polipéptidos FIX en la forma de proteasa activa, FIXa, se puede lograr mediante incubación con factor XIa. En algunos ejemplos, esto se realiza en presencia de calcio y fosfolípidos.

3. Proteínas de fusión

También se proporcionan proteínas de fusión que contienen un polipéptido FIX modificado y uno o más de otros polipéptidos. Se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen tales proteínas de fusión formuladas para administración por una ruta adecuada. Las proteínas de fusión se forman ligando en cualquier orden el polipéptido FIX modificado y un agente, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, factor de crecimiento, receptor, ligando y otro agente similar con el fin de facilitar la purificación de un polipéptido FIX, alterando las propiedades farmacodinámicas de un polipéptido FIX dirigiendo, por ejemplo, dirigiendo el polipéptido a una célula o tejido objetivo, y/o aumentando la expresión o secreción del polipéptido FIX. Típicamente, cualquier proteína de fusión FIX retiene al menos aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de actividad coagulante en comparación con un polipéptido FIX sin fusión, que incluye 96%, 97%, 98%, 99% o más de actividad coagulante en comparación con un polipéptido sin fusión.

El enlace de un polipéptido FIX con otro polipéptido puede realizarse directa o indirectamente a través de un ligador. En un ejemplo, el enlace puede ser por enlace químico, tal como a través de agentes heterobifuncionales o enlaces tiol u otros enlaces similares. La fusión también puede realizarse por medios recombinantes. La fusión de un polipéptido FIX a otro polipéptido puede ser en el extremo N o C del polipéptido FIX. Los ejemplos no limitantes de polipéptidos que se pueden usar en proteínas de fusión con un polipéptido FIX proporcionado en el presente documento incluyen, por ejemplo, un polipéptido GST (glutatión S-transferasa), dominio Fc de inmunoglobulina G, albúmina o una secuencia señal heteróloga. Las proteínas de fusión pueden contener componentes adicionales, tales como proteína de unión a maltosa *E. coli* la de(MBP) que ayuda en la absorción de la proteína por las células (véase, solicitud internacional PCT No. WO 01/32711).

Se puede producir una proteína de fusión mediante técnicas recombinantes estándar. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se pueden ligar juntos en el marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, empleando terminales con extremos romos o escalonados para la ligadura, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los terminales apropiados, relleno en los extremos cohesivos según corresponda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable y ligadura enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a voladizos complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden ser hibridados y reamplificados para generar una secuencia de genes quiméricos (ver, por ejemplo, Ausubel et al. (Eds.) Protocolos actuales en biología molecular, John Wiley & Sons, 1992). Además, muchos vectores de expresión están disponibles comercialmente que ya codifican una fracción de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica FIX puede clonarse en un vector de expresión tal que la fracción de fusión esté unida en el marco a la proteína proteasa.

4. Modificación de polipéptidos

Los polipéptidos FIX modificados se pueden preparar como cadenas de polipéptidos no modificados (o desnudo) o como polipéptidos modificados postraduccionalmente. Para algunas aplicaciones, puede ser deseable preparar FIX modificado en una forma “no cubierta” sin modificaciones postraduccionales u otras modificaciones químicas. Las cadenas de polipéptidos desnudos se pueden preparar en huéspedes adecuados que no modifiquen FIX después de la traducción. Dichos polipéptidos también pueden prepararse en *in vitro* sistemas y usando síntesis química de polipéptidos. Para otras aplicaciones, pueden desearse modificaciones particulares. En particular, para los fines de la presente, se prefiere la glicosilación de los polipéptidos FIX modificados para producir polipéptidos FIX hiperglucosilados. Dicha glicosilación puede realizarse *in vivo* usando un sistema de expresión apropiado, tal como un sistema de expresión de mamífero, *in vitro* (véase, por ejemplo, Mikami et al. (2006) J. Biotechnol. 127: 65-78), o una combinación de métodos *in vivo* e *in vitro* en los que, por ejemplo, el polipéptido FIX se expresa en células procariotas y se modifica adicionalmente *in vitro* utilizando transglicosilación enzimática (véase, por ejemplo, Schwarz et al., (2010) Nature Chem. Biol. 6: 264-266). Además, puede desearse la pegilación, albuminización, carboxilación, hidroxilación, fosforilación u otras modificaciones conocidas. Las modificaciones pueden hacerse *in vitro* o, por ejemplo, produciendo el FIX modificado en un huésped adecuado que produce tales modificaciones.

5. Secuencias de nucleótidos

En este documento se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican FIX o polipéptidos FIX modificados. Las moléculas de ácido nucleico incluyen variantes alélicas o variantes de empalme de cualquier polipéptido FIX codificado. Ejemplos de moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento son cualquiera que codifique un polipéptido FIX modificado proporcionado en el presente documento, tal como cualquiera que codifique un polipéptido establecido en cualquiera de las SEQ ID NO: 121, 122, 152, 153, 156, 161, 166, 169-173 188, 219-226, 232-244, 249-258, 260, 264-267, 326-331, 333, 334, 336-341, 342, 345-350, 353-360, 366, 368, 369, 372 -375, 378-381, 383-386, 393-395, 397, 398, 403-408, 410 y 411. En una realización, las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento tienen al menos 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 99% de identidad de secuencia o hibridarse en condiciones de rigurosidad media o alta a lo largo de al menos 70% de la longitud total de cualquier ácido nucleico que codifique un polipéptido FIX proporcionado en este documento. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento tienen al menos o por lo menos aproximadamente 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 1. En otra realización, una molécula de ácido nucleico puede incluir aquellos con secuencias de codones degenerados que codifican cualquiera de los polipéptidos FIX proporcionados aquí.

F. Evaluación de las actividades de polipéptidos FIX modificadas

Las actividades y propiedades de los polipéptidos FIX pueden evaluarse *in vitro* y/o *in vivo.* Los expertos en la técnica conocen los ensayos para dicha evaluación y se sabe que correlacionan las actividades y los resultados probados con las actividades terapéuticas e *in vivo*. En un ejemplo, las variantes de FIX se pueden evaluar en comparación con FIX no modificado y/o de tipo silvestre. Dichos ensayos se pueden realizar en presencia o ausencia de FVIIIa, fosfolípidos y/o calcio. Los ensayos *in vitro* incluyen cualquier ensayo de laboratorio conocido por un experto en la técnica, como, por ejemplo, ensayos basados en células que incluyen ensayos de coagulación, ensayos de unión, ensayos de proteínas y ensayos de biología molecular. Los ensayos *in vivo* incluyen ensayos FIX en modelos animales, así como la administración a humanos. En algunos casos, la actividad de los polipéptidos FIX *in vivo* puede determinarse evaluando sangre, suero u otro fluido corporal para determinar los determinantes del ensayo. Las variantes FIX, como las proporcionadas en el presente documento, también se pueden probar *in vivo* para evaluar una actividad o propiedad, como el efecto terapéutico.

Típicamente, los ensayos descritos aquí son con respecto a la forma activada de dos cadenas de FIX, es decir, FIXa. Los polipéptidos FIX que se han activado mediante división proteolítica después de R145 y R180 se pueden preparar *in vitro.* Los polipéptidos FIX pueden prepararse primero por cualquiera de los métodos de producción descritos en este documento, que incluyen, pero no se limitan a, producción en células de mamífero seguido de purificación. La división de los polipéptidos FIX en la forma de proteasa activa de FIX se puede lograr mediante incubación con factor XI activado (FXIa). Los polipéptidos activados pueden usarse en cualquiera de los ensayos para medir las actividades de FIX descritas en este documento. Dichos ensayos también se pueden realizar con la forma de zimógeno de cadena sencilla. Por ejemplo, un polipéptido FIX de zimógeno de cadena sencilla puede proporcionar un control negativo ya que dicha forma típicamente no exhibe la actividad proteolítica o catalítica requerida para la actividad coagulante de FIX. Además, dichos ensayos también se pueden realizar en presencia de cofactores, como FVIIIa, y otras moléculas, como fosfolípidos y/o calcio, que pueden aumentar la actividad de FIX.

1. Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* ejemplares incluyen ensayos para evaluar la modificación y actividad del polipéptido. Las modificaciones pueden evaluarse utilizando ensayos *in vitro* que evalúan la glucosilación, la γ-carboxilación y otras modificaciones postraduccionales, ensayos de proteínas y ensayos conformacionales conocidos en la técnica. Los ensayos de actividad incluyen, entre otros, la medición de la interacción FIX con otros factores de coagulación, como FVIIIa y factor X, ensayos proteolíticos para determinar la actividad proteolítica de los polipéptidos FIX, ensayos para determinar la unión y/o afinidad de los polipéptidos FIX para fosfatidilserinas y otros fosfolípidos, y ensayos basados en células para determinar el efecto de los polipéptidos FIX en la coagulación.

Las concentraciones de polipéptidos FIX modificados pueden evaluarse mediante métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, ensayos de inmunosorción enzimática (ELISA), SDS-PAGE; Bradford, Lowry, métodos BCA; Absorción UV y otros métodos de etiquetado de proteínas cuantificables, como, entre otros, métodos inmunológicos, radiactivos y fluorescentes y métodos relacionados.

La evaluación de los productos de división de las reacciones de proteólisis, incluida la división de polipéptidos FIX o productos producidos por la actividad de proteasa FIX, se puede realizar usando métodos que incluyen, pero no se limitan a, división de sustrato cromogénico, HPLC, análisis SDS-PAGE, ELISA, Western transferencia, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, secuenciación terminal de NH_2, fluorescencia y etiquetado de proteínas.

También se pueden evaluar las propiedades estructurales de los polipéptidos FIX modificados. Por ejemplo, la cristalografía de rayos X, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la microscopía crioelectrónica (crio-EM) de polipéptidos FIX modificados se pueden realizar para evaluar la estructura tridimensional de los polipéptidos FIX y/u otras propiedades de los polipéptidos FIX, tales como Ca^{2+} o cofactor vinculante.

Además, la presencia y el grado de degradación de FIX se pueden medir mediante técnicas estándar tales como electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), y transferencia Western de muestras que contienen FIX electroforizadas. Los polipéptidos FIX que han sido expuestos a proteasas también pueden someterse a secuenciación N-terminal para determinar la ubicación o los cambios en los sitios de división de los polipéptidos FIX modificados.

a. Glicosilación

Polipéptidos FIX pueden evaluarse para detectar la presencia de glicosilación utilizando métodos bien conocidos en la técnica. La glucosilación de un polipéptido se puede caracterizar por su conjunto de carbohidratos liberados enzimáticamente o químicamente, utilizando una amplia variedad de métodos, como la cromatografía de intercambio aniónico de pH alto (Townsend et al, (1991) Glycobiology 1: 139-147), o electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE) (Kumar et al., (1996) Biotechnol. Appl. Biochem. 24: 207-214.), digestiones secuenciales de exoglucosidasa (Watzlawick et al., (1992) Biochemistry 31: 12198-12203; Tyagarajan et al., (1996) Glycobiology, 6: 83-93), espectrometría de masas (Gillece-Castro et al., (1990) Meth. Enzymol. 193: 689-712; Duffin et al., (1992) Anal. Chem. 64: 1440-1448; Papac et al., (1997) en Techniques in Glycobiology (Townsend RR y Hotchkiss AT eds.) Marcel Decker, Inc., Nueva York, pp. 33-52; Fu et al., (1994) Carbohydr Res. 261: 173-186) y RMN (Fu et al., (1994) Carbohydr. Res. 261: 173-186).

Por ejemplo, la liberación química puede efectuarse por hidrazinólisis, que libera glucanos ligados a N y O de las glicoproteínas por incubación con hidrazina anhidra. La liberación enzimática puede ser efectuada por el péptido endoglicosidasas N-glucosidasa F (PNGasa F), que elimina la mayoría de los carbohidratos ligados a N comunes del polipéptido mientras hidroliza el residuo de Asn glucosilado originalmente a Asp. El tratamiento con hidrazinólisis o endoglicosidasa de polipéptidos FIX genera un término reductor que puede marcarse con una etiqueta de fluoróforo o cromóforo. Los polipéptidos FIX marcados pueden analizarse mediante electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE). La etiqueta fluorescente para los glucanos también se puede utilizar para el análisis de monosacáridos, la elaboración de perfiles o la toma de huellas de patrones de glicosilación complejos por HPLC. Los métodos ejemplares de HPLC incluyen cromatografía de interacción hidrófila, interacción electrónica, intercambio iónico, interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño. Ejemplos de sondas de glucano incluyen, pero no se limitan a, 3-(acetilamino)-6-aminoacridina (AA-Ac) y ácido 2-aminobenzoico (2-AA). Las fracciones de carbohidratos también se pueden detectar mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen el polipéptido FIX glucosilado.

En un método, la espectrometría de masas se usa para evaluar la heterogeneidad de carbohidratos específica del sitio. Esto puede implicar espectrometría de masas de ionización por desorción láser asistida por matriz de fracciones de HPLC recogidas (Sutton et al., (1994) Anal. Biochem. 218: 34-46; Ploug et al., (1998) J. Biol. Chem. 273 : 13933-13943), o HPLC de fase inversa directamente acoplado con espectrometría de masas por ionización por electropulverización (LC/ESIMS) (véase, por ejemplo, Huddleston et al., (1993) Anal. Chem. 65: 877-884; Medzihradsky et al., (2008) Methods Mol. Biol. 446: 293-316). En un ejemplo, la glicosilación en sitios potenciales de N-glicosilación, como un residuo de asparagina dentro de un motivo Asn-X-Ser/Thr/Cys, se evalúa por LC/ESIMS. Se pueden identificar los sitios potenciales de N-glicosilación en un polipéptido FIX, y se puede seleccionar una enzima proteolítica que separe estos sitios en péptidos individuales. La mezcla de digestión se analiza luego por LC/ESIMS, un método que genera iones de carbohidratos de diagnóstico por activación por colisión (33). Estos iones de carbohidratos de diagnóstico incluyen, por ejemplo, iones de oxonio terminales no reductores característicos en *m*/*z* 204, 274 y 292, 366 y 657, que indican la presencia de N-acetilhexosamina, ácido neuramínico (siálico), hexosil-N-acetilhexosamina, y sialil-hexosil-nacetilhexosamina, respectivamente. Además de identificar la presencia de estos iones mediante monitoreo selectivo de iones (SIM), el método LC/ESIMS también analiza el péptido para evaluar el peso molecular, que puede usarse para indicar qué péptido y, por lo tanto, qué sitio de N-glicosilación potencial, contiene los carbohidratos.

b. Otras modificaciones postraduccionales

Los polipéptidos FIX pueden evaluarse para detectar la presencia de modificaciones postraduccionales distintas de la glucosilación. Tales ensayos son conocidos en la técnica e incluyen ensayos para medir la hidroxilación, sulfatación, fosforilación y carboxilación. Un ensayo ejemplar para medir la β-hidroxilación comprende el análisis por HPLC de fase inversa de polipéptidos FIX que han sido sometidos a hidrólisis alcalina (Przysiecki et al. (1987) PNAS 84: 7856-7860). La carboxilación y la γ-carboxilación de polipéptidos FIX se pueden evaluar utilizando espectrometría de masas con análisis de tiempo de vuelo de ionización por desorción asistida por matriz (MALDI-TOF), como se describe para otros polipéptidos dependientes de la vitamina K (vea, por ejemplo, Harvey et al. J Biol Chem 278: 8363-8369, Maun et al. Prot Sci 14: 1171-1180). También se puede evaluar la interacción de un polipéptido FIX que contiene el propéptido (pro-FIX) con la carboxilasa responsable de la modificación de γ-carboxilato postraduccional. La constante de disociación (K_d) después de la incubación de carboxilasa con polipéptidos pro-FIX fluoresceína marcado se puede medir mediante la determinación de la cantidad de carboxilasa unido mediante anisotropía (Lin et al (2004) J Biol Chem 279: 6560-6566). Otros ensayos ejemplares para medir la carboxilación incluyen el análisis por HPLC de fase inversa de polipéptidos FIX que han sido sometidos a hidrólisis alcalina (Przysiecki et al. (1987) PNAS 84: 7856-7860).

Ensayos ejemplares para medir la fosforilación incluyen el uso de anticuerpos fosfoespecíficos para residuos de aminoácidos de fosfo-serina y/o tirosina o para un polipéptido FIX de serina-fosforilado. El etiquetado metabólico ^{32}P de

células que producen el polipéptido FIX también se puede usar para evaluar la fosforilación, en el que el polipéptido FIX marcado se puede purificar y analizar para la incorporación de fosfato radiactivo. Un ensayo ejemplar para la sulfatación de tirosina incluye el etiquetado ^{35}S de células que producen el polipéptido FIX. En dicho método, las células se incuban con $^{35}SS_2SO_4$ o ^{35}S-metionina y la incorporación de ^{35}S se determina por normalización a la muestra de metionina S^{35}.

C. Actividad proteolítica

Los polipéptidos FIX modificados pueden analizarse para determinar la actividad proteolítica hacia ambos sustratos sintéticos y su sustrato natural, Factor X. Las formas activadas de los polipéptidos FIX modificados (FIXa) se usan típicamente en el ensayo. Los ensayos que usan un sustrato sintético, como un péptido CH_3SO_2-LGR-pNA, se pueden emplear para medir la actividad de división enzimática de los polipéptidos FIXa. La hidrólisis de CH_3SO_2-LGR-pNA en presencia de FIXa se puede medir evaluando la producción de p-nitroanalina (pNA) a partir de la muestra de reacción de división. La cantidad de pNA en la muestra es proporcional a la absorbancia de la muestra a 405 nm y por lo tanto indica el grado de actividad proteolítica en la muestra FIXa. Los sustratos fluorogénicos ejemplares adicionales que se pueden usar para evaluar la actividad de división de FIXa incluyen, pero no se limitan a, Mes-D-CHD-Gly-Arg-AMC (Pefafluor FIXa10148) y HD-Leu-PHG-Arg-AMC (Pefafluor FIXa3688), en el que la división se evalúa mediante la liberación de AMC, y el sustrato de éster fluorogénico, 4-metilumbeliferil *p*'-guanidinobenzoato (MUGB), donde la división se evalúa mediante la liberación de fluoróforo de 4-metilumbeliferona (4-MU) (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3). Las moléculas que potencian la actividad catalítica de FIXa, como el etilenglicol, pueden emplearse en dichos ensayos (Sturzebecher et al. (1997) FEBS Lett (412) 295-300).

La actividad proteolítica de FIXa también se puede evaluar midiendo la conversión del factor X (FX) en el factor X activado (FXa), tal como se describe en el Ejemplo 4, a continuación. Los polipéptidos FIXa, incluidos los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento, pueden incubarse con polipéptidos FX en presencia de FVIIIa, vesículas de fosfolípidos (fosfatidilserina y/o fosfatidilcolina) y Ca^{2+}, y la división de FX para producir FXa puede ensayarse usando un agente fluorógeno. sustrato, como Spectrafluor FXa (CH_3SO_2-D-CHA-Gly-Arg-AMC), o un sustrato cromogénico, como S2222 o S2765 (Chromogenics AB, Molndal, Suecia), que son escindidos específicamente por FXa.

d. Actividad de coagulación

Los polipéptidos FIX pueden analizarse para determinar la actividad de coagulación usando ensayos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, algunos de los ensayos incluyen, entre otros, un ensayo de coagulación en dos etapas (Liebman et al., (1985) PNAS 82: 3879-3883); el ensayo del tiempo de protrombina (PT, que puede medir la actividad dependiente de TF de FIXa en la ruta extrínseca); ensayos que son modificaciones de la prueba de PT; el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT, que puede medir la actividad independiente de TF de FIXa); tiempo de coagulación activado (ACT); tiempo de coagulación activado recalcificado; 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 FIX modificado se puede determinar mediante un ensayo basado en PT en el que FIX se diluye en plasma deficiente en FIX y se mezcla con reactivo de tiempo de protrombina (TF recombinante con fosfolípidos y calcio), tal como el disponible como Innovin™ de Dade Behring. La formación de coágulos se detecta ópticamente y se determina el tiempo de coagulación y se compara con plasma deficiente en FIX solo. Los ensayos de coagulación *in vivo* en modelos animales, como los que se describen a continuación, también se pueden realizar para evaluar la actividad de coagulación de los polipéptidos FIX.

e. Unión y/o inhibición por otras proteínas y moléculas

Los ensayos de inhibición se pueden usar para medir la resistencia de los polipéptidos FIX modificados a los inhibidores FIX, como, por ejemplo, antitrombina III (AT-III), heparaína, AT-III/complejo de heparina, p-aminobenzamidina, inhibidores de la serina proteasa y anticuerpos específicos de FIX. La evaluación de la inhibición a otros inhibidores también se puede probar e incluir, entre otros, otros inhibidores de la serina proteasa. La inhibición se puede evaluar por incubación del inhibidor con polipéptidos FIX que se han incubado previamente con y/o sin FVIIIa. La actividad de FIX se puede medir usando uno o más de los ensayos de actividad o coagulación descritos anteriormente, y la inhibición por el inhibidor se puede evaluar comparando la actividad de los polipéptidos FIX incubados con el inhibidor, con la actividad de los polipéptidos FIX que no fueron incubados con el inhibidor. Por ejemplo, la inhibición de polipéptidos FIX modificados por AT-III/heparina se puede evaluar cómo se describe en el Ejemplo 5, a continuación. La inhibición de las variantes FIXa o FIXa de tipo silvestre por el complejo AT-III/heparina se evalúa incubando AT-III/heparina con FIXa y midiendo la actividad catalítica de FIXa hacia un sustrato de molécula pequeña, Mesil-D-CHG-Gly- Arg-AMC (Pefafluor FIXa; Pentapharm). Dichos ensayos pueden realizarse en presencia o ausencia de FVIIIa.

Los polipéptidos FIX también se pueden analizar para determinar la unión a otros factores e inhibidores de la coagulación. Por ejemplo, las interacciones directas e indirectas de FIX con cofactores, como FVIIIa, sustratos, como FX y FIX, e inhibidores, como antitrombina III y heparina, se pueden evaluar utilizando cualquier ensayo de unión conocido en la técnica, que incluye, entre otros a, inmunoprecipitación, purificación de columna, SDS-PAGE no reductora, ensayos BIAcore®, resonancia de plasmón superficial (SPR), transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), polarización de fluorescencia (FP), calorimetría de titulación isotérmica (ITC), dicroísmo circular (CD), ensayos de complementación de fragmentos de proteínas (PCA), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN),

dispersión de luz, equilibrio de sedimentación, cromatografía de filtración en gel de zona pequeña, retardo de gel, transferencia de lejano oeste, polarización de fluorescencia, huella de proteínas de radicales hidroxilo, visualización de fagos, y varios sistemas de dos híbridos.

e. Afinidad de fosfolípidos

La unión y/o afinidad de polipéptidos FIX modificados por fosfatidilserina (PS) y otros fosfolípidos pueden determinarse usando ensayos bien conocidos en la técnica. Los fosfolípidos altamente puros (por ejemplo, concentraciones conocidas de PS bovino y fosfatidilcolina de huevo (PC), que están disponibles comercialmente, tal como de Sigma, en solventes orgánicos se pueden usar para preparar pequeñas vesículas de fosfolípidos unilamelares. Fijar la unión del polipéptido a estos PS/PC Las vesículas se pueden determinar mediante la dispersión relativa de la luz a 90° de la luz incidente. La intensidad de la dispersión de la luz con PC/PS solo y con PC/PS/FIX se mide para determinar la constante de disociación (Harvey et al., (2003) J. Biol. Chem. 278: 8363-8369). La resonancia plasmática superficial, como en un instrumento biosensor BIAcore, también se puede utilizar para medir la afinidad de los polipéptidos FIX por las membranas de fosfolípidos (Sun et al, (2003) Blood 101: 2277-2284).

2. Modelos animales no humanos

Los modelos animales no humanos pueden usarse para evaluar la actividad y la estabilidad de los polipéptidos FIX modificados. Por ejemplo, los animales no humanos pueden usarse como modelos para una enfermedad o afección. A los animales no humanos se les puede inyectar sustancias inductoras del fenotipo y/o enfermedad antes de la administración de variantes FIX para controlar los efectos sobre la progresión de la enfermedad. Los modelos genéticos también son útiles. Se pueden generar animales, como ratones, que imitan una enfermedad o afección mediante la sobreexpresión, subexpresión o modificación de uno o más genes. Dichos animales pueden generarse mediante técnicas de producción de animales transgénicos bien conocidas en la técnica o usando cepas mutantes inducidas o de origen natural. Los ejemplos de modelos animales no humanos útiles de enfermedades asociadas con FIX incluyen, pero no se limitan a, modelos de trastornos hemorrágicos, en particular hemofilia. Estos modelos animales no humanos se pueden usar para monitorizar la actividad de variantes FIX en comparación con un polipéptido FIX de tipo silvestre.

Los modelos animales también pueden usarse para monitorizar la estabilidad, la vida útil, la depuración y otras propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los polipéptidos FIX modificados. Tales ensayos son útiles para comparar polipéptidos FIX modificados y para calcular dosis y regímenes de dosis para ensayos adicionales en humanos y animales no humanos. Por ejemplo, se puede inyectar un polipéptido FIX modificado en la vena de la cola de los ratones. Luego se toman muestras de sangre en puntos de tiempo después de la inyección (como minutos, horas y días después) y luego se evalúan las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los polipéptidos FIX modificados, como monitorizando el suero o el plasma en puntos de tiempo específicos para actividad FIXa y concentración de proteínas por ELISA o radioinmunoensayo (véase, por ejemplo, el Ejemplo 6). Las muestras de sangre también se pueden analizar para determinar la actividad de coagulación en métodos, como el ensayo aPTT (véase, por ejemplo, el Ejemplo 6).

Los polipéptidos FIX modificados pueden analizarse para determinar su eficacia terapéutica usando modelos animales para la hemofilia. En un ejemplo no limitativo, se puede usar un modelo animal como un ratón. Los modelos de hemofilia en ratones están disponibles en la técnica e incluyen ratones deficientes en FIX (como los utilizados en el Ejemplo 7, más adelante) y ratones que expresan polipéptidos FIX mutantes, y pueden emplearse para probar polipéptidos FIX modificados (Wang et al., (1997) PNAS 94: 11563-11566; Lin et al., (1997) Blood 90: 3962-3966; Kundu et al., (1998) Blood 92: 168-174; Sabatino et al., (2004) Blood 104(9) : 2767-2774; y Jin et al., (2004) Blood 104: 1733-1739; véase también el Ejemplo 7).

Otros modelos de deficiencias de FIX incluyen perros hemofílicos que expresan FIX defectuoso o que se han hepatectomizado (Evans et al, (1989) PNAS 86: 10095; Mauser et al., (1996) Blood 88: 3451; y Kay et al., (1994) PNAS 91: 2353-2357).

3. Ensayos clínicos

Muchos ensayos están disponibles para evaluar la actividad de FIX para uso clínico. Dichos ensayos pueden incluir la evaluación de la coagulación, la estabilidad de la proteína y la vida útil *in vivo* y los ensayos fenotípicos. Los ensayos fenotípicos y los ensayos para evaluar el efecto terapéutico del tratamiento con FIX incluyen la evaluación de los niveles sanguíneos de FIX (como la medición de FIX en suero antes de la administración y los puntos temporales posteriores a las administraciones, incluidos, después de la primera administración, inmediatamente después de la última administración, y el tiempo) puntos intermedios, corrigiendo el índice de masa corporal (IMC), la respuesta fenotípica al tratamiento con FIX, incluida la mejora de los síntomas a lo largo del tiempo en comparación con los sujetos tratados con un FIX o placebo sin modificar y/o de tipo silvestre. Se pueden encontrar ejemplos de ensayos clínicos para evaluar la actividad FIX, como en Franchini et al., (2005) Thromb Haemost. 93(6): 1027-1035; Shapiro et al., (2005) Blood 105(2): 518-525; y White et al., (1997) Thromb. Haemost 78(1): 261-265. Los pacientes pueden ser monitoreados regularmente durante un período de tiempo para administraciones rutinarias o repetidas, después de la administración en respuesta a eventos agudos, como hemorragia, trauma o procedimientos quirúrgicos.

G. Formulación y administración

En el presente documento se proporcionan composiciones para uso en el tratamiento de trastornos hemorrágicos. Dichas composiciones contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido Factor IX como se describe en el presente documento. Las concentraciones efectivas de polipéptidos FIX o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se mezclan con un portador o vehículo farmacéutico adecuado para administración sistémica, tópica o local. Los compuestos se incluyen en una cantidad efectiva para tratar el trastorno seleccionado. La concentración del compuesto activo en la composición dependerá de la absorción, inactivación, tasas de excreción del compuesto activo, el programa de dosificación y la cantidad administrada, así como otros factores conocidos por los expertos en la técnica.

Los portadores o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos proporcionados en el presente documento incluyen cualquiera de dichos vehículos conocidos por los expertos en la materia como adecuados para el modo particular de administración. Las composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido FIX descrito en este documento también pueden proporcionarse como un polvo liofilizado que se reconstituye, tal como con agua estéril, inmediatamente antes de la administración.

1. Formulaciones

Las composiciones farmacéuticas que contienen un FIX modificado pueden formularse de cualquier manera convencional mezclando una cantidad seleccionada del polipéptido con uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. La selección del portador o excipiente está dentro de la habilidad de la profesión administradora y puede depender de varios parámetros. Estos incluyen, por ejemplo, el modo de administración (es decir, sistémico, oral, nasal, pulmonar, local, tópico o cualquier otro modo) y el trastorno tratado. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden formularse para administración de dosificación única (directa) o para dilución u otra modificación. Las concentraciones de los compuestos en las formulaciones son efectivas para el suministro de una cantidad, después de la administración, que es efectiva para el tratamiento pretendido. Típicamente, las composiciones se formulan para administración de dosis única. Para formular una composición, la fracción en peso de un compuesto o mezcla de los mismos se disuelve, suspende, dispersa o se mezcla de otro modo en un vehículo seleccionado a una concentración efectiva tal que la afección tratada se alivie o mejore.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden formularse para administración a un sujeto como una proteína FIXa de dos cadenas. Los polipéptidos FIX modificados se pueden activar por cualquier método conocido en la técnica antes de la formulación. Por ejemplo, FIX puede activarse mediante incubación con FXIa, como FXIa inmovilizado en perlas. El calcio se puede incluir en estos procesos para garantizar la activación completa y el plegamiento correcto de la proteína FIXa modificada. Los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí también pueden formularse para administración como una proteína de cadena única. Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden formularse de modo que las formas de cadena sencilla y cadena doble estén contenidas en la composición farmacéutica, en cualquier proporción mediante la selección apropiada del medio para eliminar o controlar la autoactivación.

El compuesto puede ser suspendido en forma adecuada micronizada u otra o puede derivarse para producir un producto activo más soluble. La forma de la mezcla resultante depende de una serie de factores, incluido el modo de administración previsto y la solubilidad del compuesto en el portador o vehículo seleccionado. Las mezclas resultantes son soluciones, suspensiones, emulsiones y otras mezclas similares, y se pueden formular como una mezcla no acuosa o acuosa, cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles., irrigaciones, aerosoles, supositorios, vendajes o cualquier otra formulación adecuada para administración sistémica, tópica o local. Para la administración interna local, como la administración intramuscular, parenteral o intraarticular, los polipéptidos pueden formularse como una suspensión en solución en un medio acuoso, como solución salina tamponada isotónicamente o se combinan con un soporte biocompatible o bioadhesivo para administración interna. La concentración efectiva es suficiente para mejorar la condición objetivo y puede determinarse empíricamente. Para formular una composición, la fracción en peso del compuesto se disuelve, se suspende, se dispersa o se mezcla de otro modo en un vehículo seleccionado a una concentración efectiva tal que la condición objetivo se alivie o mejore.

Generalmente, las composiciones farmacéuticamente aceptables se preparan en vista de las aprobaciones para una agencia reguladora u otra preparada de acuerdo con la farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y en humanos. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores tales como un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra una isoforma. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluidos los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es un vehículo típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener junto con un ingrediente activo: un diluyente como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico o carboximetilcelulosa; un lubricante, como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tales como goma arábiga, gelatina, glucosa, melaza, polvinilpirrolidina, celulosas y derivados de las mismas,

povidona, crospovidonas y otros aglutinantes similares conocidos por los expertos en la materia. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. . Una composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato de trietanolamina sódico, oleato de trietanolamina y otros agentes similares. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para usar en un inhalador o insuflador pueden formularse con una mezcla en polvo de un compuesto terapéutico y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón. Una composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales como los triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y otros agentes similares. Las preparaciones para administración oral también pueden formularse adecuadamente con inhibidores de proteasa, tales como un inhibidor de Bowman-Birk, un inhibidor de Bowman-Birk conjugado, aprotinina y camostato. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en “Remington's Pharmaceutical Sciences” de EW Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto, generalmente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración adecuada a un sujeto o paciente.

La formulación debe adaptarse al modo de administración. Por ejemplo, el FIX modificado puede formularse para administración parenteral mediante inyección (por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua). Las composiciones inyectables pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,4-butanodiol. Los aceites estériles fijos se emplean convencionalmente como solvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, que incluye, entre otros, mono o diglicéridos sintéticos, ácidos grasos (incluido el ácido oleico), aceites vegetales naturales como el aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de maní, aceite de semilla de algodón y otros aceites o vehículos grasos sintéticos como el oleato de etilo. Los tampones, conservantes, antioxidantes y los ingredientes adecuados pueden incorporarse según se requiera o, como alternativa, pueden comprender la formulación.

Los polipéptidos se pueden formular como el único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o se pueden combinar con otros ingredientes activos. Los polipéptidos pueden ser dirigidos para la entrega, como por conjugación a un agente de direccionamiento, como un anticuerpo. Las suspensiones de liposomas, incluidos los liposomas dirigidos a tejidos, también pueden ser adecuados como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones de liposomas se pueden preparar como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 4.522.811. La administración de liposomas también puede incluir formulaciones de liberación lenta, que incluyen matrices farmacéuticas tales como geles de colágeno y liposomas modificados con fibronectina (véase, por ejemplo, Weiner et al., (1985) J. Pharm. Sci. 74(9): 922-5) . Las composiciones proporcionadas en el presente documento además pueden contener uno o más adyuvantes que facilitan la administración, tales como, pero sin limitación, portadores inertes o sistemas de dispersión coloidal. Ejemplos representativos y no limitativos de tales portadores inertes pueden seleccionarse de agua, alcohol isopropílico, fluorocarbonos gaseosos, alcohol etílico, polivinilpirrolidona, propilenglicol, un material productor de gel, alcohol estearílico, ácido esteárico, espermaceti, monooleato de sorbitán, metilcelulosa, así como combinaciones adecuadas de dos o más de los mismos.

El compuesto activo se incluye en el portador farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios no deseados en el sujeto tratado. La concentración terapéuticamente efectiva puede determinarse empíricamente probando los compuestos en sistemas conocidos *in vitro* e *in vivo*, tales como los ensayos proporcionados aquí.

a. Dosis

La cantidad o dosis precisa del agente terapéutico administrado depende del polipéptido FIX particular, la ruta de administración y otras consideraciones, tales como la gravedad de la enfermedad y el peso y el estado general del sujeto. La administración local del agente terapéutico requerirá típicamente una dosificación menor que cualquier modo de administración sistémica, aunque la concentración local del agente terapéutico puede, en algunos casos, ser mayor después de la administración local de lo que se puede lograr con seguridad tras la administración sistémica. Si es necesario, se puede determinar empíricamente o extrapolar una dosis y un protocolo de tratamiento y duración particulares. Por ejemplo, se pueden usar dosis ejemplares de polipéptidos FIX recombinantes y nativos como punto de partida para determinar las dosis apropiadas. Por ejemplo, un polipéptido FIX recombinante (rFIXa) que se ha activado a rFIXa, BeneFIX® Factor IX se ha administrado a pacientes con hemofilia B para el tratamiento de hemorragias, así como en entornos profilácticos y quirúrgicos a varias dosis. La dosificación y la duración del tratamiento con FIX recombinante dependen de la gravedad de la deficiencia de factor IX, la ubicación y el grado de hemorragia, y el estado clínico del paciente, la edad y la recuperación del factor IX. Por ejemplo, los pacientes con hemofilia B grave (actividad FIX de <1 UI/dL; 1% de la actividad normal (donde 1 UI representa la actividad del Factor IX en 1 ml de plasma

agrupado normal) requerirá más FIX transfundido que pacientes con hemofilia B moderada (actividad FIX de 1-5 UI/dL; 1-5% de la actividad normal) o leve (actividad FIX de >5 - <40 UI/ml; >5 - <40% de la actividad normal). La dosis inicial estimada de BeneFIX® Factor IX se puede determinar utilizando la siguiente fórmula: Unidades requeridas = peso corporal (kg) x aumento deseado del factor IX (UI/dL o % de normal) x recuperación recíproca u observada (UI/kg por UI/dL). En estudios clínicos con pacientes adultos y pediátricos (<15 años), una UI de BeneFIX por kilogramo de peso corporal aumentó la actividad circulante del factor IX de la siguiente manera: Adultos: 0.8 ± 0.2 UI/dL [rango 0.4 a 1.2 UI/dL]; Pediátrico: 0.7 ± 0.3 UI/dL [rango 0.2 a 2.1 UI/dL]. Por lo tanto, para pacientes adultos:

El número de UI de Factor IX requerido (UI) = peso corporal (kg) x aumento de factor IX deseado (% o UI/dL) x 1.3 (UI/kg por UI/dL),

y, para pacientes pediátricos:

El número de UI de Factor IX requerido (UI) = peso corporal (kg) x aumento de factor IX deseado (% o UI/dL) x 1.4 (UI/kg por UI/dL),

La Tabla 11 establece la dosis típica utilizada para varios episodios graves de hemorragia.

Tabla 11.

Tipo de hemorragia	**Se requiere actividad FIX circulante (% o UI/dL)**	**Intervalo de dosificación (horas)**	**Duración de la terapia (días)**
Menor:	20-30	12-24	1-2
Hemartrosis, músculo superficial o tejido blando sin complicaciones			
Moderado:	25-50	12-24	Trate hasta que se detenga la hemorragia y comience la curación, alrededor de 2 a 7 días
Intramuscular o tejido blando con disección, membranas mucosas, extracciones dentales o hematuria			
Mayor:	50-100	12-24	7-10
Faringe, retrofaringe, retroperitoneo, SNC, cirugía			

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento pueden ser eficaces en cantidades de dosificación reducidos y/o frecuencias reducidas en comparación con FIX recombinante nativa. Por ejemplo, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden administrarse a intervalos de dosificación menos frecuentes, tales como 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas o más. En otros ejemplos, se pueden administrar menos dosis de los polipéptidos FIX modificados. Por ejemplo, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento pueden administrarse solo una vez para lograr la coagulación. En algunas realizaciones, las dosis de FIX modificado se reducen en comparación con FIX nativo. Por ejemplo, las dosis pueden ser menores o aproximadamente 1 UI/kg, 2 UI/kg, 3 UI/kg, 4 UI/kg, 5 UI/kg, 6 UI/kg, 7 UI/kg, 8 UI/kg, 9 UI/kg, 10 UI/kg, 20 UI/kg, 30 UI/kg, 40 UI/kg o 50 UI/kg, 60 UI/kg, 70 UI/kg, 80 UI/kg, 90 UI/kg o 100 UI/kg. La dosis, la duración del tratamiento y el intervalo entre inyecciones variarán con la gravedad de la hemorragia y la respuesta del paciente al tratamiento, y pueden ajustarse en consecuencia. Factores como el nivel de actividad y la vida útil del FIX modificado en comparación con el FIX no modificado se pueden tener en cuenta al hacer determinaciones de dosis. Dosis y regímenes particulares pueden determinarse empíricamente. Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado que exhibe una vida útil más larga que un polipéptido FIX no modificado se puede administrar a dosis más bajas y/o con menos frecuencia que el polipéptido FIX no modificado. De manera similar, las dosis requeridas para el efecto terapéutico usando un polipéptido FIX modificado que muestra una mayor actividad coagulante en comparación con un polipéptido FIX no modificado se pueden reducir en frecuencia y cantidad. Dosis y regímenes particulares pueden ser determinados empíricamente por un experto en la materia.

b. Formas de dosificación

Los compuestos farmacéuticamente terapéuticamente activos y sus derivados se formulan y administran típicamente en formas de dosificación unitarias o formas de dosificación múltiples. Las formulaciones se pueden proporcionar para la administración a humanos y animales en formas de dosificación que incluyen, entre otras, comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles, soluciones o suspensiones orales y emulsiones de agua y aceite que contienen cantidades adecuadas. de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de compuesto terapéuticamente

activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Los ejemplos de formas de dosis unitarias incluyen ampollas y jeringas y comprimidos o cápsulas empaquetadas individualmente. En algunos ejemplos, la dosis unitaria se proporciona como un polvo liofilizado que se reconstituye antes de la administración. Por ejemplo, se puede proporcionar un polipéptido FIX como polvo liofilizado que se reconstituye con una solución adecuada para generar una solución de inyección de dosis única. En algunas realizaciones, el polvo liofilizado puede contener el polipéptido FIX y componentes adicionales, tales como sales, de modo que la reconstitución con agua destilada estéril da como resultado un polipéptido FIX en una solución tamponada o salina. Las formas de dosis unitarias pueden administrarse en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitarias idénticas envasadas en un único recipiente para ser administradas en forma de dosis unitaria segregada. Los ejemplos de formas de dosis múltiples incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o frascos de pintas o galones. Por lo tanto, la forma de dosis múltiple es un múltiplo de dosis unitarias que no están segregadas en el empaque.

2. Administración de polipéptidos FIX modificados

Los polipéptidos FIX proporcionados aquí (es decir, poniendo compuestos activos) se pueden administrar *in vitro, ex vivo* o *in vivo* al poner en contacto una mezcla, tal como un fluido corporal u otra muestra de tejido, con un polipéptido FIX. Por ejemplo, cuando se administra un compuesto *ex vivo,* una muestra de tejido o fluido corporal de un sujeto puede ponerse en contacto con los polipéptidos FIX que están recubiertos en un tubo o filtro, como, por ejemplo, un tubo o filtro en una máquina de derivación. Cuando se administran *in vivo,* los compuestos activos se pueden administrar por cualquier vía apropiada, por ejemplo, oral, nasal, pulmonar, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraarticular, intracisternal, intraocular, intraventricular, intratecal, intramuscular, intraperitoneal, intratraqueal o tópica., así como por cualquier combinación de dos o más de los mismos, en forma líquida, semi-líquida o sólida y se formulan de una manera adecuada para cada vía de administración. Los polipéptidos FIX modificados se pueden administrar una vez o más de una vez, tal como dos, tres veces, cuatro veces o cualquier cantidad de veces que se requiera para lograr un efecto terapéutico. Se pueden realizar múltiples administraciones a través de cualquier ruta o combinación de rutas, y se pueden administrar cada 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 ubicación del trastorno hemorrágico. En general, los polipéptidos FIX se administrarán mediante inyección intravenosa en bolo, con un tiempo de administración (infusión) de aproximadamente 2-5 minutos. En otros ejemplos, los niveles sanguíneos deseables de FIX se pueden mantener mediante una infusión continua del agente activo según lo determinado por los niveles plasmáticos. Cabe señalar que el médico tratante sabría cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la terapia para reducir la dosis debido a la toxicidad o disfunciones de la médula ósea, el hígado o los riñones. Por el contrario, el médico tratante también sabría cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo los efectos secundarios tóxicos). En otros ejemplos, la ubicación del trastorno hemorrágico podría indicar que la formulación FIX se administra a través de rutas alternativas. Por ejemplo, la administración local, incluida la administración en el cerebro (por ejemplo, intraventricularmente) podría realizarse cuando el paciente experimenta hemorragia en esta región. De manera similar, para el tratamiento de la hemorragia en las articulaciones, se puede emplear la administración local por inyección del agente terapéutico en la articulación (es decir, por vía intraarticular, intravenosa o subcutánea). En otros ejemplos, la administración tópica del agente terapéutico a la piel, por ejemplo, formulada como una crema, gel o pomada, o la administración a los pulmones por inhalación o intratraquealmente, puede ser apropiada cuando la hemorragia se localiza en estas áreas.

En los casos en que los polipéptidos FIX modificados se formulan como una preparación de depósito, las formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos terapéuticos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

Las composiciones, si se desea, pueden presentarse en un paquete, en un kit o dispositivo dispensador, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El paquete, por ejemplo, contiene papel de aluminio o plástico, como un blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones de administración. Las composiciones que contienen los agentes activos se pueden empaquetar como artículos de fabricación que contienen material de embalaje, un agente proporcionado en este documento y una etiqueta que indica el trastorno para el que se proporciona el agente.

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

También se proporcionan composiciones de moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos FIX modificados y vectores de expresión que los codifican que son adecuados para terapia génica. En lugar de administrar la proteína, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo,* como por vía sistémica o por otra vía, o *ex vivo,* como mediante la eliminación de células, incluidos los linfocitos, la introducción del nucleico en el mismo y la reintroducción en el huésped o un dispositivo compatible.

Los polipéptidos FIX modificados pueden administrarse a células y tejidos mediante la expresión de moléculas de ácido nucleico. Los polipéptidos FIX modificados se pueden administrar como moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos FIX modificados, incluidas las técnicas *ex vivo* y la expresión directa *in vivo*. Los ácidos nucleicos pueden administrarse a células y tejidos mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia. Las secuencias de ácido nucleico aisladas pueden incorporarse en vectores para su posterior manipulación. Como se usa en el presente documento, el vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se usan para introducir ADN heterólogo en las células para su expresión o replicación. La selección y el uso de tales vehículos están dentro de la habilidad del artesano.

Los métodos para administrar polipéptidos FIX modificados mediante la expresión de moléculas de ácido nucleico codificantes incluyen la administración de vectores recombinantes. El vector puede diseñarse para permanecer episómicos, como mediante la inclusión de un origen de replicación o puede integrarse en un cromosoma en la célula. Los polipéptidos FIX modificados también se pueden usar en *ex vivo* la terapia de expresión génica usando vectores no virales. Por ejemplo, las células se pueden diseñar para expresar un polipéptido FIX modificado, tal como al integrar un ácido nucleico codificador de polipéptido FIX modificado en una ubicación genómica, ya sea operativamente unida a secuencias reguladoras o de manera que se coloque operativamente unida a secuencias reguladoras en un ubicación genómica Dichas células pueden administrarse local o sistémicamente a un sujeto, como un paciente que necesita tratamiento.

Se pueden emplear vectores virales, por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), viruela, virus herpes, retrovirus y otros diseñados para terapia génica. Los vectores pueden permanecer episómicos o pueden integrarse en los cromosomas del sujeto tratado. Un polipéptido FIX modificado puede ser expresado por un virus, que se administra a un sujeto que necesita tratamiento. Los vectores virales adecuados para la terapia génica incluyen adenovirus, virus adenoasociados (AAV), retrovirus, lentivirus, virus vaccinia y otros mencionados anteriormente. Por ejemplo, la tecnología de expresión de adenovirus es bien conocida en la técnica y los métodos de producción y administración de adenovirus también son bien conocidos. Los serotipos de adenovirus están disponibles, por ejemplo, de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). El adenovirus puede usarse *ex vivo,* por ejemplo, las células se aíslan de un paciente que necesita tratamiento y se transducen con un vector de adenovirus que expresa el polipéptido FIX modificado. Después de un período de cultivo adecuado, las células transducidas se administran a un sujeto, local y/o sistémicamente. Alternativamente, las partículas de adenovirus que expresan polipéptidos FIX modificados se aíslan y formulan en un vehículo farmacéuticamente aceptable para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad o afección de un sujeto. Típicamente, las partículas de adenovirus se administran a una dosis que varía de 1 partícula a 10^{14} partículas por kilogramo de peso sujeto, generalmente entre 10^{6} u 10^{8} partículas a 10^{12} partículas por kilogramo de peso sujeto. En algunas situaciones, es deseable proporcionar una fuente de ácido nucleico con un agente que se dirija a las células, como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular o una célula objetivo, o un ligando para un receptor en una célula objetivo. FIX también puede ser dirigido para la entrega en tipos de células específicas. Por ejemplo, los vectores adenovirales que codifican los polipéptidos FIX se pueden usar para la expresión estable en células que no se dividen, como las células hepáticas (Margaritis et al. (2004) J Clin Invest 113: 1025-1031). En otro ejemplo, los vectores virales o no virales que codifican los polipéptidos FIX se pueden transducir en células aisladas para su posterior suministro. Los tipos de células adicionales para la expresión y la administración de FIX podrían incluir, pero no se limitan a, fibroblastos y células endoteliales.

Las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en cromosomas artificiales y otros vectores no virales. Los cromosomas artificiales, como ACES (véase, Lindenbaum et al., (2004) Nucleic Acids Res. 32(21): e172) pueden modificarse para codificar y expresar la isoforma. En resumen, los cromosomas artificiales de mamíferos (MAC) proporcionan un medio para introducir grandes cargas de información genética en la célula en un formato de integración autónoma y no integrante. Único entre los MAC, la expresión de cromosomas artificiales (ACE) satelital de mamíferos basada en el ADN puede generarse reproducciones *de forma novo* en estirpes celulares de diferentes especies y purificarse fácilmente de los cromosomas de las células huésped. Los ACE de mamíferos purificados se pueden reintroducir en una variedad de estirpes celulares receptoras donde se han mantenido de manera estable durante períodos prolongados en ausencia de presión selectiva utilizando un sistema ACE. Con este enfoque, se ha logrado la carga específica de uno o dos objetivos genéticos en células LMTK(-) y CHO.

Otro método para introducir ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de FIX modificado es una técnica de sustitución de genes de dos pasos en la levadura, a partir de un genoma de adenovirus completo (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 casete de expresión para el gen de interés y un marcador seleccionable positivo y negativo. Los YAC son de particular interés porque permiten la incorporación de genes más grandes. Este enfoque puede usarse para la construcción de vectores basados en adenovirus que portan ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los polipéptidos FIX modificados descritos para la transferencia de genes a células de mamíferos o animales enteros.

Los ácidos nucleicos pueden encapsularse en un vehículo, tal como un liposoma, o introducirse en células, tal como una célula bacteriana, particularmente una bacteria atenuada o introducirse en un vector viral. Por ejemplo, cuando se emplean liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada con la

endocitosis se pueden usar para direccionar y/o para facilitar la absorción, por ejemplo, proteínas de la cápsida o fragmentos trópicos de las mismas para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que sufren internalización en el ciclo y proteínas que se dirigen a la localización intracelular y mejoran la vida útil intracelular.

Para métodos *ex vivo* e *in vivo*, las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido FIX modificado se introducen en células que provienen de un donante adecuado o del sujeto a tratar. Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico para fines de terapia incluyen, por ejemplo, cualquier tipo de célula disponible deseado apropiado para la enfermedad o afección a tratar, que incluye pero no se limita a células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, músculo células, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre hematopoyéticas o células progenitoras, por ejemplo, como células madre obtenidas de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal y otras fuentes de las mismas.

Para el tratamiento *ex vivo*, las células de un donante compatible con el sujeto a tratar o las células del sujeto a tratar se eliminan, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al sujeto. El tratamiento incluye la administración directa, tal como, por ejemplo, encapsulado dentro de membranas porosas, que se implantan en el paciente (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos No. 4,892,538 y 5,283,187). Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas y lípidos catiónicos (por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol), electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano y métodos de precipitación con fosfato de calcio. Los métodos de suministro de ADN pueden usarse para expresar polipéptidos FIX modificados *in vivo.* Tales métodos incluyen el suministro de ácidos nucleicos por liposomas y el suministro de ADN desnudo, incluido el suministro local y sistémico, tal como el uso de electroporación, ultrasonido y suministro de fosfato de calcio. Otras técnicas incluyen microinyección, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microceldas y fusión de esferoplastos.

La expresión *in vivo* de un polipéptido FIX modificado se puede unir a la expresión de moléculas adicionales. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido FIX modificado puede vincularse con la expresión de un producto citotóxico tal como en un virus modificado genéticamente o expresarse en un virus citotóxico. Dichos virus pueden dirigirse a un tipo de célula particular que es un objetivo para un efecto terapéutico. El polipéptido FIX modificado expresado se puede usar para mejorar la citotoxicidad del virus.

La expresión *in vivo* de un polipéptido FIX modificado puede incluir ligar operativamente una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido FIX modificado a secuencias reguladoras específicas tales como un promotor específico de células o tejidos. Los polipéptidos FIX modificados también se pueden expresar a partir de vectores que infectan y/o replican específicamente en tipos de células y/o tejidos diana. Los promotores inducibles pueden usarse para regular selectivamente la expresión de polipéptidos FIX modificados. Un sistema de expresión regulable ejemplar es el sistema de expresión génica inducible por doxiciclina, que se ha utilizado para regular la expresión de FIX recombinante (Srour et al., (2003) Thromb. Haemost. 90(3): 398-405).

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

La administración también puede ser directa, tal como mediante la administración de un vector o células que típicamente se dirigen a una célula o tejido. Por ejemplo, las células tumorales y la proliferación pueden ser células dirigidas para la expresión in vivo de polipéptidos FIX modificados. Las células utilizadas para la expresión *in vivo* de un polipéptido FIX modificado también incluyen células autólogas para el paciente. Dichas células pueden eliminarse de un paciente, introducirse ácidos nucleicos para la expresión de un polipéptido FIX modificado, y luego administrarse a un paciente tal como mediante inyección o injerto.

H. Usos terapéuticos

Los polipéptidos FIX modificados y las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento se pueden usar para el tratamiento de cualquier afección para la que se emplea FIX no modificado. Así, por ejemplo, los polipéptidos FIX modificados se pueden usar como procoagulantes para el tratamiento de trastornos hemorrágicos, incluidos trastornos hemorrágicos congénitos y adquiridos, como la hemofilia. Típicamente, por lo tanto, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento son procoagulantes que se usan en el tratamiento de trastornos hemorrágicos. Sin embargo, en otros ejemplos particulares, los polipéptidos FIX modificados pueden usarse como anticoagulantes. Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado hiperglucosilado que también contiene una o más modificaciones que dan como resultado una falta de actividad catalítica para su sustrato, FX, puede usarse como anticoagulante para tratar trastornos trombóticos.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento tienen actividad terapéutica solos o en combinación con otros agentes. Los polipéptidos modificados proporcionados en el presente documento están diseñados para retener la actividad terapéutica, pero exhiben propiedades modificadas, tales como propiedades

farmacocinéticas y farmacodinámicas mejoradas, resistencia aumentada a los inhibidores y/o actividad catalítica mejorada. Tales propiedades y actividades modificadas, por ejemplo, pueden mejorar la efectividad terapéutica de los polipéptidos. Los polipéptidos FIX modificados y las moléculas de ácido nucleico codificantes proporcionadas en el presente documento pueden usarse para el tratamiento de cualquier afección para la que se emplea FIX no modificado. Esta sección proporciona usos ejemplares y métodos de administración. Estas terapias descritas son solo ejemplares y no limitan las aplicaciones de polipéptidos FIX modificados.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden usarse en diversos métodos terapéuticos, así como de diagnóstico en los que se emplea FIX. Dichos métodos incluyen, entre otros, métodos de tratamiento de afecciones fisiológicas y médicas descritas y enumeradas a continuación. Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden exhibir una mejora de las actividades *in vivo* y efectos terapéuticos en comparación con el FIX de tipo silvestre, que incluye dosis más bajas para lograr el mismo efecto, un efecto terapéutico más sostenido y otras mejoras en la administración y el tratamiento.

Los polipéptidos FIX modificados descritos en el presente documento pueden exhibir propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas mejoradas, mayor actividad catalítica, mayor resistencia a los inhibidores y/o mayor actividad coagulante en comparación con un polipéptido FIX no modificado. Dichos polipéptidos pueden usarse como procoagulantes para el tratamiento de, por ejemplo, trastornos hemorrágicos, incluidos trastornos hemorrágicos congénitos y trastornos hemorrágicos adquiridos. En algunos ejemplos, los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí que tienen sitios de glucosilación no nativos también contienen modificaciones que dan como resultado un polipéptido FIX modificado que inhibe la coagulación, de modo que el polipéptido FIX modificado es un anticoagulante y puede usarse para tratar, por ejemplo, enfermedades y trastornos trombóticos. Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en este documento pueden usarse para administrar terapias más estables y de mayor duración. Los ejemplos de mejoras terapéuticas que utilizan polipéptidos FIX modificados incluyen, entre otros, dosis más bajas, menos administraciones y/o menos frecuentes, efectos secundarios disminuidos y efectos terapéuticos aumentados.

Típicamente, los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí son procoagulantes y pueden usarse para tratar trastornos hemorrágicos, incluidos trastornos hemorrágicos congénitos y trastornos hemorrágicos adquiridos. En ejemplos particulares, los polipéptidos FIX modificados están destinados a su uso en métodos terapéuticos en los que se han utilizado otros polipéptidos FIX modificados y no modificados para el tratamiento. Las enfermedades y trastornos ejemplares que pueden tratarse con los polipéptidos FIX modificados, solos o en combinación con otros agentes, incluidos otros procoagulantes, incluyen, pero no se limitan a, trastornos de coagulación de la sangre, enfermedades hematológicas, trastornos hemorrágicos, hemofilia B, en particular hemofilia B y trastornos sanguíneos adquiridos, incluido la hemorragia asociado con trauma y cirugía. En algunas realizaciones, las hemorragias a tratar por los polipéptidos FIX se producen en órganos tales como el cerebro, la región del oído interno, los ojos, el hígado, los pulmones, el tejido tumoral y el tracto gastrointestinal. En otras realizaciones, la hemorragia es difusa, como en la gastritis hemorrágica y la hemorragia uterino profuso.

Los pacientes con trastornos hemorrágicos, como la hemofilia, a menudo corren el riesgo de hemorragia y sangrado excesivo durante la cirugía, incluida la extracción dental o el trauma. Dichos pacientes a menudo tienen hemartrosis aguda (hemorragias en las articulaciones), artropatía hemofílica crónica, hematomas (como, muscular, retroperitoneal, sublingual y retrofaríngeo), hemorragias en otros tejidos, hematuria (hemorragia del tracto renal), hemorragia cerebral y gastrointestinal. hemorragias (como hemorragias UGI), que pueden tratarse con polipéptidos FIX modificados. Por lo tanto, en algunos ejemplos, los polipéptidos FIX modificados se usan para tratar episodios de hemorragia debido a trauma o cirugía, o recuento reducido o actividad de plaquetas, en un sujeto. Los métodos ejemplares para pacientes sometidos a cirugía incluyen tratamientos para prevenir hemorragias y tratamientos antes, durante o después de las cirugías.

Aunque típicamente los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento exhiben una actividad coagulante mejorada en comparación con un polipéptido FIX modificado, en algunos ejemplos, los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden contener uno o más sitios de glicosilación no nativos y también carecen de actividad de peptidasa funcional. Tales polipéptidos FIX modificados se pueden usar en métodos terapéuticos para inhibir la coagulación de la sangre (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos número de serie 6.315.995). Los polipéptidos FIX modificados que inhiben la coagulación de la sangre pueden usarse en métodos anticoagulantes de tratamiento para trastornos isquémicos y trombóticos. En pacientes quirúrgicos con un mayor riesgo de coagulación excesiva, como los pacientes con trombosis venosa profunda (TVP) o trombosis venosa superficial (TSV), los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento que son anticoagulantes se pueden administrar para prevenir la coagulación excesiva en cirugías. En algunos casos, el tratamiento se realiza con FIX solo. En algunos casos, FIX se administra junto con factores de anticoagulación adicionales según lo requiera la afección o enfermedad a tratar.

El tratamiento de enfermedades y afecciones con polipéptidos FIX modificados se puede efectuar por cualquier vía de administración adecuada usando formulaciones adecuadas como se describe en el presente documento, que incluyen, pero no se limitan a, inyección, administración pulmonar, oral y transdérmica. Si es necesario, se puede determinar empíricamente o extrapolar una dosis y un protocolo de tratamiento y duración particulares. Por ejemplo, las dosis ejemplares de polipéptidos FIX recombinantes y nativos, como las dosis recomendadas de BeneFIX® Factor de

coagulación IX (recombinante) como se describió anteriormente, pueden usarse como punto de partida para determinar las dosis apropiadas. Los polipéptidos FIX modificados que están hiperglucosilados y tienen una vida útil aumentada *in vivo,* o que tienen una mayor resistencia a los inhibidores, o tienen una mayor actividad catalítica, pueden ser efectivos a cantidades y/o frecuencias de dosificación reducidas. Las dosificaciones y los regímenes de dosificación para polipéptidos FIX no modificados se pueden usar como guía para determinar las dosificaciones para los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí. Factores como la vida útil y el nivel de actividad del FIX modificado en comparación con el FIX no modificado se pueden utilizar para hacer tales determinaciones. Dosis y regímenes particulares pueden determinarse empíricamente.

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

El efecto de los polipéptidos FIX sobre el tiempo de coagulación de la sangre se puede monitorizar usando cualquiera de las pruebas de coagulación conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, el tiempo de tromboplastina parcial (PTT) en sangre total, el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), el tiempo de coagulación activado (ACT), el tiempo de coagulación activado recalcificado o el tiempo de coagulación Lee-White.

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

Hemofilia

La hemofilia es un trastorno hemorrágico provocado por una deficiencia en uno o más factores de coagulación sanguínea. Se caracteriza por una capacidad disminuida para formar coágulos de sangre en sitios de daño tisular. Las hemofilias congénitas ligadas al cromosoma X incluyen hemofilia A y hemofilia B, o enfermedad de Navidad, que son causadas por deficiencias en FVIII y FIX, respectivamente. La hemofilia A ocurre a una tasa de 1 de cada 10,0000 hombres, mientras que la hemofilia B ocurre en 1 de cada 50,000 hombres.

Los pacientes con hemofilia sufren hemorragias recurrentes en las articulaciones y los músculos, que pueden ser espontáneas o en respuesta a un trauma. La hemorragia puede causar dolor agudo intenso, restringir el movimiento y provocar complicaciones secundarias, incluida la hipertrofia sinovial. Además, la hemorragia recurrente en las articulaciones puede causar sinovitis crónica, que puede causar daño en las articulaciones, destruyendo el sinovio, el cartílago y el hueso.

Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento y los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden usarse en terapias para la hemofilia, incluido el tratamiento de afecciones hemorrágicas asociadas con la hemofilia. Los polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, para controlar o prevenir episodios de hemorragia espontáneo o para controlar o prevenir la hemorragia en respuesta a traumatismos o procedimientos quirúrgicos.

Los polipéptidos FIX modificados en el presente documento pueden exhibir propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas mejoradas, tales como una vida útil en suero mejorada, una mayor resistencia a los inhibidores, una mayor actividad catalítica y/o una mayor actividad coagulante. Por lo tanto, los polipéptidos FIX modificados se pueden usar para administrar terapias para la hemofilia más duraderas o mejoradas. Los ejemplos de mejoras terapéuticas que utilizan polipéptidos FIX modificados incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a dosis más bajas, administraciones menos y/o menos frecuentes, efectos secundarios disminuidos y efectos terapéuticos aumentados.

Los polipéptidos FIX modificados pueden analizarse para determinar su eficacia terapéutica, por ejemplo, utilizando modelos animales. Por ejemplo, los ratones con deficiencia de FIX, o cualquier otro modelo de enfermedad conocido para la hemofilia, se pueden tratar con polipéptidos FIX modificados. La progresión de los síntomas y fenotipos de la enfermedad se controla para evaluar los efectos de los polipéptidos FIX modificados. Los polipéptidos FIX modificados también se pueden administrar a modelos animales, así como a sujetos, como en ensayos clínicos, para evaluar la efectividad *in vivo* en comparación con controles de placebo y/o controles que usan FIX no modificado.

a. Hemofilia B

La hemofilia B se puede manejar eficazmente con la administración de terapéuticos FIX. Los pacientes con hemofilia B grave tienen una actividad FIX de <1 UI/dL (1% de la actividad normal), los pacientes con hemofilia B moderada tienen una actividad FIX de 1-5 UI/dL (1-5% de la actividad normal) y los pacientes con hemofilia B leve tienen una actividad FIX de >5 - <40 UI/ml (>5 - <40% de la actividad normal). Con la terapia de reemplazo profiláctico adecuada y/o el tratamiento de episodios hemorrágicos particulares con una cantidad apropiada de FIX, los pacientes a menudo pueden alcanzar una vida normal. La administración de FIX puede ayudar a controlar la hemorragia durante la cirugía, el trauma, la extracción dental o para aliviar la hemorragia asociado con hemartrosis, hematuria, hemorragia mucocutánea, como epistaxis o hemorragia del tracto gastrointestinal, lesiones quísticas en hueso subperióstico o tejido blando, o hematomas, que causan complicaciones neurológicas como hemorragia intracraneal, hemorragia del canal espinal. La muerte en pacientes con hemofilia a menudo es el resultado de una hemorragia en el sistema nervioso central. Otras complicaciones graves en pacientes hemofílicos incluyen el desarrollo de inhibidores de la terapéutica y la enfermedad del factor de coagulación.

Las alteraciones más frecuentes en el gen FIX en pacientes con hemofilia B son mutaciones puntuales, en particular mutaciones sin sentido. La mayoría de las mutaciones FIX identificadas se producen en residuos de aminoácidos en la región de codificación del gen FIX, que a menudo afecta a los aminoácidos conservados evolutivamente. La gravedad de la hemofilia depende de la naturaleza de la mutación. Las mutaciones en la región de codificación pueden afectar una serie de propiedades o actividades diferentes del polipéptido FIX, incluida la alteración de la actividad de la proteasa, la unión del cofactor, la división del péptido señal o del propéptido, las modificaciones postraduccionales y la inhibición de la división de FIX en su forma activada. Otros tipos de mutaciones puntuales incluyen mutaciones sin sentido que producen un polipéptido FIX truncado inestable y mutaciones de desplazamiento de marco (pequeñas eliminaciones e inserciones) que dan como resultado una molécula FIX terminalmente aberrante. Además, se pueden encontrar mutaciones puntuales FIX en la región promotora, lo que puede alterar las secuencias de reconocimiento de varias proteínas reguladoras de genes específicos, lo que resulta en una transcripción reducida del factor IX de coagulación. La disminución de FIX como resultado de anomalías transcripcionales se denomina hemofilia B Leyden. Una mutación ejemplar en la región promotora incluye la interrupción del sitio de unión de UFH-4, que afecta la regulación de la transcripción FIX por el receptor de andrógeno. La gravedad de este tipo de hemofilia se rige por los niveles de andrógenos en la sangre, que aumentan durante la pubertad y alivian parcialmente la deficiencia transcripcional de FIX (Kurachi *et al.* (1995)). Otros cambios de nucleótidos sin sentido afectan el procesamiento del transcrito de ARN primario del factor IX. Por ejemplo, algunas mutaciones ocurren en secuencias de consenso de donante-empalme (GT) conservado evolutivamente y aceptor-empalme (AG), que pueden crear uniones de empalme crípticas e interrumpir el ensamblaje de los empalmesomas. Algunos casos graves de hemofilia (aproximadamente el 10%) se presentan con grandes eliminaciones en el gen FIX.

El tratamiento de la deficiencia de FIX y, por lo tanto, la hemofilia B, implica con mayor frecuencia la administración de FIX, incluidas formas recombinantes de FIX, preparaciones de FIX de plasma purificado o concentrados de plasma purificado. Por lo tanto, de manera similar, los polipéptidos FIX modificados en el presente documento, y los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos FIX modificados, se pueden usar para el tratamiento de la hemofilia B. Los polipéptidos FIX modificados en el presente documento pueden exhibir propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas mejoradas, como una vida útil en suero mejorada, una mayor resistencia a inhibidores, mayor actividad catalítica y/o mayor actividad coagulante. Por lo tanto, los polipéptidos FIX modificados pueden usarse para administrar terapias mejoradas para la hemofilia. Los ejemplos de mejoras terapéuticas que utilizan polipéptidos FIX modificados incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a dosis más bajas, administraciones menos y/o menos frecuentes, efectos secundarios disminuidos y efectos terapéuticos aumentados.

b. Hemofilia A

La hemofilia A, que representa aproximadamente el 85% de todos los casos de hemofilia, resulta de mutaciones en el gen del factor VIII en el cromosoma X, lo que conduce a una deficiencia o disfunción de la proteína FVIII. Por lo general, no se recomienda el tratamiento de la hemofilia A con polipéptidos FIX nativos, incluidos los polipéptidos FIX recombinantes como el Factor IX de coagulación BeneFIX® (recombinante) o los polipéptidos FIX purificados por plasma porque el polipéptido FIX nativo requiere FVIIIa para que la actividad catalítica efectúe la coagulación. Sin embargo, los polipéptidos FIX modificados, como los descritos aquí, que contienen una o más modificaciones para aumentar la actividad intrínseca de FIX, se pueden usar en el tratamiento de la hemofilia B. Tales polipéptidos tienen actividad independiente de FVIII y, por lo tanto, pueden funcionar como un coagulante. en pacientes con hemofilia A. Por ejemplo, los polipéptidos FIX modificados descritos anteriormente, como los que contienen una o más modificaciones para introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación no nativos, y/o una o más modificaciones para aumentar la resistencia a AT-III y/o heparina, y que también contienen una o más modificaciones para aumentar la actividad del polipéptido FIX modificado en ausencia de FVIIIa, pueden usarse para tratar episodios de hemorragia en pacientes con hemofilia A.

Modificaciones para aumentar la actividad intrínseca de un polipéptido FIX tal que puede actuar de una manera independiente del FVIIIa se describe anteriormente y en otras partes (véase, por ejemplo, Hopfner et al., (1997) EMBO J. 16: 6626-6635; Kolkman et al., (2000) Biochem. 39: 7398-7405; Sichler et al., (2003) J. Biol. Chem 278: 4121-4126;

Begbie et al., (2005) Thromb Haemost. 94(6): 1138-47, Patente de Estados Unidos No. 6.531.298 y Publicaciones de Patente de Estados Unidos No. 20080167219 y 20080214461) e incluyen, entre otros, reemplazos de aminoácidos V86A, V86N, V86D, V86E, V86 Q, V86G, V86H, V86I, V86L, V86M, V86F, V86S, V86T, V86W, V86Y, Y259F, A261K, K265T, E277V, E277A, E277N, E277D, E277Q, E277G, E277H, E277, E277, E277, E277, E27, 27 E277S, E277T, E277W, E277Y, R338A, R338V, R338I, R338F, R338W, R338S, R338T, Y345F, I383V y E388G. Por ejemplo, un polipéptido FIX modificado proporcionado aquí puede contener las sustituciones de aminoácidos Y259F/K265T, Y259F/K265T/Y345F, Y259F/A261K/K265T/Y345F, Y259F/K265T/Y345F/I383V/E388G o Y259F/A26/65/26/I383V/E388G y puede exhibir una mayor actividad intrínseca. Tales polipéptidos FIX modificados se pueden usar, por lo tanto, en el tratamiento de la hemofilia A.

J. Terapias de combinación

Cualquiera de los polipéptidos FIX modificados y las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos FIX modificados descritos en el presente documento se pueden administrar en combinación con, antes de, de forma intermitente o posterior a otros agentes o procedimientos terapéuticos que incluyen, entre otros, otros productos biológicos, compuestos de moléculas pequeñas y cirugía. Para cualquier enfermedad o afección, incluidas todas las ejemplificadas anteriormente, para FIX está indicado o se ha usado y para el cual están disponibles otros agentes y tratamientos, FIX se puede usar en combinación con el mismo. Por lo tanto, los polipéptidos FIX modificados proporcionados aquí de manera similar se pueden usar. Dependiendo de la enfermedad o afección a tratar, las combinaciones ejemplares incluyen, entre otras, la combinación con otros factores de coagulación purificados o recombinantes en plasma, procoagulantes, anticoagulantes, anticuerpos anticoagulantes, glucosaminoglucanos, heparinas, heparinoides, derivados de heparina, medicamentos de tipo heparina, cumarinas, como warfarina y derivados de cumarina. Los procoagulantes adicionales que pueden usarse en terapias combinadas con polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento que tienen propiedades procoagulantes incluyen, pero no se limitan a, vitamina K, derivados de vitamina K, otros factores de coagulación e inhibidores de proteína C. Los anticoagulantes adicionales que pueden usarse en terapias combinadas con polipéptidos FIX modificados proporcionados en el presente documento que tienen propiedades anticoagulantes incluyen, pero no se limitan a, antagonistas de adrenoreceptor β2, antagonistas de neuropéptido V2, análogos de prostaciclina, inhibidores de tromboxano sintasa, agonistas de calcio, inhibidores de elastasa, no moléculas antiinflamatorias esteroides, inhibidores de trombina, inhibidores de lipoxigenasa, inhibidores de FVIIa, inhibidores de FXa, inhibidores de fosfodiesterasa III, fibrinógeno, antagonistas de la vitamina K y antagonistas de glucoproteína IIb/IIIa.

K. Artículos de fabricación y kits

Los compuestos farmacéuticos de polipéptidos FIX modificados para ácidos nucleicos que codifican polipéptidos FIX modificados, o un derivado o una porción biológicamente activa de los mismos, pueden envasarse como artículos de fabricación que contienen material de envasado, una composición farmacéutica que es eficaz para tratar una enfermedad o trastorno mediado por FIX, y una etiqueta que indica que el polipéptido FIX modificado o la molécula de ácido nucleico se utilizará para tratar una enfermedad o trastorno mediado por FIX.

Los artículos de fabricación proporcionados en este documento contienen materiales de embalaje. Los materiales de envasado para su uso en el envasado de productos farmacéuticos son bien conocidos por los expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 5,323,907, 5,033,252 y 5,052,558. Los ejemplos de materiales de envasado farmacéutico incluyen, entre otros, blísteres, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, botellas y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y el modo de administración y tratamiento previsto. Se contempla una amplia gama de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionados en el presente documento, así como una variedad de tratamientos para cualquier enfermedad o trastorno mediado por FIX.

Los polipéptidos FIX modificados y las moléculas de ácido nucleico también se pueden proporcionar como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en este documento y un artículo para administración. Por ejemplo, un FIX modificado se puede suministrar con un dispositivo para la administración, como una jeringa, un inhalador, un vaso dosificador, un gotero o un aplicador. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones para la aplicación, incluyendo dosis, regímenes de dosificación e instrucciones para los modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en este documento y un elemento para diagnóstico. Por ejemplo, tales kits pueden incluir un elemento para medir la concentración, cantidad o actividad de FIX o un sistema regulado por FIX de un sujeto.

Los siguientes ejemplos se incluyen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

L. Ejemplos

Ejemplo 1

Clonación y expresión de polipéptidos del Factor IX

A. Clonación del gen FIX

El ácido nucleico que codifica el polipéptido precursor FIX humano de 461 aminoácidos (P00740; expuesto en la SEQ ID NO: 1) se clonó en el vector de expresión de mamífero, pFUSE-hIgG1-Fc2 (abreviado aquí como pFUSE) (InvivoGen; SEQ ID NO: 23), que contiene un promotor compuesto, hEF1-HTLV, que comprende el promotor central del factor de elongación-1α (EF-1α) y el R segmento y parte de la secuencia U5 (R-U5') de la repetición terminal larga tipo 1 del virus de leucemia de células T humanas (HTLV). El kit de clonación por PCR In-Fusion CF Dry-Down (Clontech) se utilizó de acuerdo con las condiciones especificadas por el proveedor.

Para el proceso In-Fusion, el plásmido pFUSE sin la porción Fc de inmunoglobulina humana 1 (hIgG1) se linealizó usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el cebador directo pFUSE-Acc-F1: GTGCTAGCTGGCCAGACATGATAAG (SEQ ID NO: 24) y el cebador inverso pFUSE-Acc-R3: CATGGTGGCCCTCCTTCGCCGGTGATC (SEQ ID NO: 25), y se usó como aceptor de ADN. La secuencia de codificación de longitud completa de FIX se amplificó por PCR usando ADNc FIX humano (Origene) como plantilla con el cebador directo FIX-wtsp-Invivo-F1: CGAAGGAGGGCCACCATGCAGCGCGTGAACATGATC (SEQ ID NO: 26) y cebador inverso FIX-Invivo-RI: TGTCTGGCCAGCTAGCACTTAAGTGAGCTTTGTTTTTTCC (SEQ ID NO: 27). Para dos secuencias de cebador de amplificación de donantes FIX establecidas anteriormente, tanto la secuencia de inicio FIX 'ATG' como la secuencia complementaria de codones de parada 'TAA' están subrayadas en las secuencias de cebador directa e inversa, respectivamente. Las regiones de homología de 18 nt de largo, una cola de cebador 5' sin hibridación para In-Fusion, se muestran en negrita. La reacción de PCR estándar y las condiciones de termociclado se usaron junto con el kit de mezcla maestra de alta fidelidad Phusion (New England Biolabs), según lo recomendado por el fabricante. Ambos receptores y productos de PCR Donantes fueron digeridos con la enzima de restricción DpnI para eliminar fondos de plantillas de PCR metiladas dam derivadas de *E. coli*. Luego se mezclaron entre sí, y la reacción In-Fusion se realizó utilizando las condiciones especificadas por el proveedor. La mezcla de reacción se transformó en E. *coli* Células supercompetentes XL1Blue (Stratagene). Las colonias se seleccionaron en placas de agar 2xYT suplementadas con 25 ppm de Zeocin (InvivoGen). El ADN plasmídico se aisló de clones seleccionados y se secuenciaron para verificar la clonación correcta.

B. Generación de variantes FIX

Se generaron variantes FIX utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange Lightning (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con oligonucleótidos específicamente diseñados que sirvieron como cebadores para incorporar mutaciones diseñadas en el ADN recién sintetizado. Los cebadores complementarios que incluyen las mutaciones deseadas se extendieron durante el ciclo usando ADN de plásmido pFUSE superenrollado bicatenario purificado que contenía la secuencia de ADNc de FIX clonada como plantilla. La extensión de los cebadores dio como resultado la incorporación de las mutaciones de interés en las cadenas recién sintetizadas, y dio como resultado un plásmido mutado con mellas escalonadas. Después de la amplificación, el producto de mutagénesis se digirió con la enzima de restricción DpnI para eliminar las cadenas parentales metiladas del ADN pFUSE derivado de *E. coli*. El ADN se transformó luego en células supercompetentes XL1Blue de *E. coli* (Stratagene) seguido de selección en placas de agar 2xYT suplementadas con 25 ppm de Zeocin (InvivoGen). El ADN plasmídico se aisló de clones seleccionados y se secuenciaron para verificar la incorporación de mutación(es) en la(s) ubicación(es) deseada(s) en el gen FIX.

La secuencia de nucleótidos de uno de los oligonucleótidos de cada par cebador complementario utilizado para generar el FIX variantes se proporciona en la Tabla 12. El nucleótido triplete secuencias que codifican un amino sustituido de ácido se muestran en mayúsculas. Por ejemplo, para generar una variante FIX que contenga las sustituciones A103N/N105S (A[103]N/N[105]S por numeración de quimotripsina; SEQ ID NO: 77), el cebador A103N/N105S Directo y un cebador que es complementarios a A103N/N105S Directo, se usaron para reemplazar una secuencia 'GCTgatAAC' de tipo silvestre de 9 pb con una secuencia mutante 'AATgatAGC' de 9 pb (los tripletes de nucleótidos modificados se indican en mayúsculas).

La Tabla 12 a continuación expone los cebadores oligonucleotídicos utilizados para la mutagénesis FIX. Los tripletes mutantes se muestran en mayúsculas, y los nombres de los cebadores corresponden a la mutación, por numeración de quimotripsina, producida como resultado de la mutagénesis usando el cebador.

Nombre de cebador	Secuencia (5' a 3') de cebador	SEQ ID NO.
F9-A[103]N/ N[105]S-For	gtaaaaatagtAATgatAGCaaggtggtttg	28
F9-D[104]N/ K[106]S-For	gtaaaaatagtgctAATaacAGTgtggtttgctcctgtactg	29
F9-K[106]N/ V[108]S-For	gtgctgataacAATgtgAGTtgctcctgtactg	30

Nombre de cebador	Secuencia (5' a 3') de cebador	SEQ ID NO.
F9-D[85]N-For	gaactgtgaattaAATgtaacatgtaac	31
F9-T[148]A-For	ctcacccgtgctgagGCTgtttttcctgatgtg	32
F9-D39N/F41T-For	gaatggtaaagttAATgcaACCtgtggaggctctatc	33
F9-K63N-For	gaaactggtgttAACattacagttgtcgc	34
F9-I86S-For	gcgaaatgtgAGTcgaattattcctc	35
F9-A95bS-For	caactacaatgcaAGTattaataagtacaac	36
F9-K243N-For	aaggaaaaaacaAATctcacttaagtgctagctg	37
F9-E240N-For	ctggattaagAATaaaacaaagctc	38
F9-E74N-For	caggtgaacataatattAACgagacagaacatacag	39
F9-T76N/H78S-For	gaacataatattgaggagAACgaaAGTacagagcaaaag	40
F9-K82N/N84S-For	cagaacatacagagcaaAATcgaTCTgtgattcgaattattc	41
F9-L153N-For	gggagatcagctAATgttcttcagtac	42
F9-F145N/H147S-For	ctggggaagagtcAACTCCaaagggagatcag	43
F9-K222N/K224S-For	gagtgtgcaatgAACggcTCAtatggaatatatac	44
F9-S151N/L153S-For	cttccacaaagggagaAATgctTCAgttcttca	45
F9-N95S-For	cctcaccacaactacAGTgcagctattaataagtacaacc	46
F9-Y117N-For	cttagtgctaaacagcAACgttacacctatttgc	47
F9-G149N-For	ggaagagtcttccacaaaAACagatcagctttagttc	48
F9-R150N/A152S-For	gtcttccacaaagggAACtcaTCTttagttcttcagtac	49
F9-R150A-For	gtcttccacaaagggGCAtcagctttagttcttcag	50
F9-R150E-For	gtcttccacaaagggGAAtcagctttagttcttcag	51
F9-R150Y-For	gtcttccacaaagggTACtcagctttagttcttcag	52
F9-R143Q-For	gtaagtggctggggaCAAgtcttccacaaaggg	53
F9-R143A-For	gtaagtggctggggaGCAgtcttccacaaaggg	54
F9-R143Y-For	gtaagtggctggggaTACgtcttccacaaaggg	55
F9-R143L-For	gtaagtggctggggaCTGgtcttccacaaaggg	56

Nombre de cebador	Secuencia (5' a 3') de cebador	SEQ ID NO.
F9-V38M-For	gttttgaatggtaaaATGgatgcattctgtggaggc	57
F9-V38Y-For	gttttgaatggtaaaTACgatgcattctgtggaggc	58
F9-D39M-For	gttttgaatggtaaagttATGgcattctgtggaggc	59
F9-D39Y-For	gttttgaatggtaaagttTACgcattctgtggaggc	60
F9-A40M-For	gttttgaatggtaaagttgatATGttctgtggaggctctatc	61
F9-A40Y-For	gttttgaatggtaaagttgatTACttctgtggaggctctatc	62
F9-R233A/K230A-For	caaatatggaatatataccGCAgtatccGCAtatgtcaactg gattaag	63
F9-R233E/K230E-For	caaatatggaatatataccGAAgtatccGAAtatgtcaactg gattaag	64
F9-R233A-For	gaatatataccaaggtatccGCAtatgtcaactggattaag	65
F9-R233E-For	gaatatataccaaggtatccGAAtatgtcaactggattaag	66
F9-K230A-For	caaatatggaatatataccGCAgtatcccggtatgtc	67
F9-K230E-For	caaatatggaatatataccGAAgtatcccggtatgtc	68
F9-K126E-For	cctatttgcattgctgacGAAgaatacacgaacatc	69
F9-K126A-For	cctatttgcattgctgacGCAgaatacacgaacatc	70
F9-R165A-For	gttccacttgttgacGCAgccacatgtcttcgatct	71
F9-R165E-For	gttccacttgttgacGAAgccacatgtcttcgatct	72
F9-R170A-For	cgagccacatgtcttGCAtctacaaagttcacc	73
F9-R170E-For	cgagccacatgtcttGAAtctacaaagttcacc	74
F9-D[64]N-For	ggcggcagttgcaagAACgacattaattcctatG	273
F9-D[64]A-For	ggcggcagttgcaagGCTgacattaattcctatG	274
F9-N[157]Q-For	cctgatgtggactatgtaCAGtctactgaagctgaaacc	275
F9-N[157]D-For	cctgatgtggactatgtaGACtctactgaagctgaaacc	276
F9-N[167]Q-For	gaaaccattttggatCAGatcactcaaagcacc	277
F9-N[167]D-For	gaaaccattttggatGACatcactcaaagcacc	278

Nombre de cebador	Secuencia (5' a 3') de cebador	SEQ ID NO.
F9-S[61]A-For	ccatgtttaaatggcggcGCTtgcaaggatgacattaattcc	279
F9-S[53]A-For	gatggagatcagtgtgagGCTaatccatgtttaaatggc	280
F9-T[159]A-For	gtggactatgtaaattctGCTgaagctgaaaccattttg	281
F9-T[169]A-For	Cattttggataacatc GCTcaaagcacccaatcatttaatga c	282
F9-T[172]A-For	gataacatcactcaaagcGCTcaatcatttaatgac	283
F9-T[179]A-For	caatcatttaatgacttcGCTcgggttgttggtggagaaG	284
F9-Y[155]F-For	gtttttcctgatgtggacTTCgtaaattctactgaagctG	285
F9-Y[155]H-For	gtttttcctgatgtggacCACgtaaattctactgaagctG	286
F9-Y[155]Q-For	gtttttcctgatgtggacCAGgtaaattctactgaagctG	287
F9-S[158]A-For	gtggactatgtaaatGCTactgaagctgaaacc	288
F9-S[158]D-For	gtggactatgtaaatGACactgaagctgaaacc	289
F9-S[158]E-For	gtggactatgtaaatGAGactgaagctgaaacc	290
F9-R165S-For	gttccacttgttgacAGCgccacatgtcttcgatct	291
F9-R170L-For	cgagccacatgtcttCTGtctacaaagttcacc	292
F9-K148N-For	ggaagagtcttccacAACgggagatcagctttaG	293
F9-K148A-For	ggaagagtcttccacGCTgggagatcagctttaG	294
F9-K148E-For	ggaagagtcttccacGAGgggagatcagctttaG	295
F9-K148S-For	ggaagagtcttccacAGCgggagatcagctttaG	296
F9-K148M-For	ggaagagtcttccacATGgggagatcagctttaG	297
F9-E74S-For	ggtgaacataatattAGCgagacagaacatacaG	298
F9-E74A-For	ggtgaacataatattGCTgagacagaacatacaG	299
F9-E74R-For	ggtgaacataatattAGGgagacagaacatacaG	300
F9-E74K-For	ggtgaacataatattAAGgagacagaacatacaG	301
F9-H92F-For-Corr	cgaattattcctcacTTCaactacaatgcaGC	302
F9-H92Y-For-Corr	cgaattattcctcacTACaactacaatgcaGC	303

Nombre de cebador	Secuencia (5' a 3') de cebador	SEQ ID NO.
F9-H92E-For-Corr	cgaattattcctcacGAAaactacaatgcaGC	304
F9-H92S-For-Corr	cgaattattcctcacAGCaactacaatgcaGC	305
F9-T242A-For	CtggattaaggaaaaaGCTaagctcacttaagtg	306
F9-T242V-For	CtggattaaggaaaaaGTGaagctcacttaagtg	307
F9-E240N/T242A-For	gtcaactggattaagAACaaaGCTaagctcacttaagtg	308
F9-E240N/T242V-For	gtcaactggattaagAACaaaGTGaagctcacttaagtg	309
F9-E240Q-For	gtcaactggattaagCAGaaaacaaagctcacttaaG	310
F9-E240S-For	gtcaactggattaagAGCaaaacaaagctcacttaaG	311
F9-E240A-For	gtcaactggattaagGCTaaaacaaagctcacttaaG	312
F9-E240D-For	gtcaactggattaagGACaaaacaaagctcacttaaG	313
F9-N178D-For	CAaagttcaccatctatGACaacatgttctgtgctggc	314
F9-N178Y-For	CAaagttcaccatctatTACaacatgttctgtgctggc	315
F9-Y177A-For	CTacaaagttcaccatcGCTaacaacatgttctgtGC	316
F9-Y177T-For	CTacaaagttcaccatcACCaacaacatgttctgtGC	317
F9-T175R-For	cttcgatctacaaagttcAGGatctataacaacatgttc	318
F9-T175E-For	cttcgatctacaaagttcGAAatctataacaacatgttc	319
F9-T175Q-For	cttcgatctacaaagttcCAGatctataacaacatgttc	320
F9-F174I-For	GTcttcgatctacaaagATCaccatctataacaacatg	321
F9-T175R/Y177T-For	cgatctacaaagttcAGGatcACCaacaacatgttctgtG	322
F9-Y94F/K98T-For	GAattattcctcaccacaacTTCaatgcagctattaatACCt acaaccatgacattG	323
F9-F145N/K148S-For	ggctggggaagagtcAACcacAGCgggagatcagctttaG	324

La Tabla 13 a continuación expone las variantes de FIX que se generaron, con las mutaciones indicadas usando numeración relativa al polipéptido FIX maduro establecido en SEQ ID NO: 3, y también la numeración de quimotripsina.

Tabla 13. Variantes FIX.

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
CatalystBiosciences WT	CatalystBiosciences WT	3
N157D	N[157]D	75
Y155F	Y[155]F	76
A103N/N 105S	A[103]N/N[105]S	77
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	78
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	79
D85N	D[85]N	80
T148A	T[148]A	81
K5A	K[5]A	82
D64N	D[64]N	83
D64A	D[64]A	84
N167D	N[167]D	85
N167Q	N[167]Q	86
S61A	S[61]A	87
S53A	S[53]A	88

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
T159A	T[159]A	89
T169A	T[169]A	90
T172A	T[172]A	91
T179A	T[179]A	92
Y155H	Y[155]H	93
Y155Q	Y[155]Q	94
S158A	S[158]A	95
S158D	S[158]D	96
S158E	S[158]E	97
N157Q	N[157]Q	98
D203N/F205T	D39N/F41T	99
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	100
K228N	K63N	101
D85N/K228N	D[85]N/K63N	102
I251S	I86S	103
D85N/I251S	D[85]N/I86S	104

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/186S	105
A262S	A95bS	106
K413N	K243N	107
E410N	E240N	108
E239N	E74N	109
T241N/H243S	T76N/H78S	110
K247N/N249S	K82N/N84S	111
L321N	L153N	112
F314N/H315S	F145N/H147S	113
K392N/K394S	K222N/K224S	114
S319N/L321S	S151N/L153S	115
N260S	N95S	116
Y284N	Y117N	117
G317N	G149N	118
R318N/A320S	R150N/A152S	119
R318A	R150A	120

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
R318E	R150E	121
R318Y	R150Y	122
R312Q	R143Q	123
R312A	R143A	124
R312Y	R143Y	125
R312L	R143L	126
V202M	V38M	127
V202Y	V38Y	128
D203M	D39M	129
D203Y	D39Y	130
A204M	A40M	131
A204Y	A40Y	132
K400A/R403A	K230A/R233A	133
K400E/R403E	K230E/R233E	134
R403A	R233A	135
R403E	R233E	136

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
K400A	K230A	137
K400E	K230E	138
K293E	K126E	139
K293A	K126A	140
R333A	R165A	141
R333E	R165E	142
R338A	R170A	143
R338E	R170E	144
R338A/R403A	R170A/R233A	145
R338E/R403E	R170E/R233E	146
K293A/R403A	K126A/R233A	147
K293E/R403E	K126E/R233E	148
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	149
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	150
R318A/R403A	R150A/R233A	151
R318E/R403E	R150E/R233E	152

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
R318Y/E410N	R150Y/E240N	153
R338E/E410N	R170E/E240N	154
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	155
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	156
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	157
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	158
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	159
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	160
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	161
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	162
K228N/E410N	K63N/E240N	163
K228N/R338E	K63N/R170E	164
K228N/R338A	K63N/R 170A	165
K228N/R318Y	K63N/R150Y	166
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	167
R403E/E410N	R233E/E240N	168

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	169
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	170
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	171
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	172
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	173
R333S	R165S	186
R338L	R170L	187
K316N	K148N	189
K316A	K148A	190
K316E	K148E	191
K316S	K148S	192
K316M	K148M	193
E239S	E74S	194
E239A	E74A	195
E239R	E74R	196
E239K	E74K	197

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
H257F	H92F	198
H257Y	H92Y	199
H257E	H92E	200
H257S	H92S	201
T412A	T242A	202
T412V	T242V	203
E410N/T412A	E240N/T242A	204
E410N/T412V	E240N/T242V	205
E410Q	E240Q	174
E410S	E240S	175
E410A	E240A	176
E410D	E240D	206
N346D	N178D	207
N346Y	N178Y	208
F314N/K316S	F145N/K148S	177
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	217

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	218
K228N/I251S	K63N/I86S	180
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	181
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	182
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	219
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	220
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	221
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	222
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	223
D104N/K106S/R318Y/E410N/R338E	D[104]N/K[106]S/R150Y/E240N/R170E	224
1251S/R318Y/E410N/R338E	I86S/R150Y/E240N/R170E	225
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N/	D[104]N/K[106]S/186S/R150Y/R170E/E240N	226
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	178
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	179
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	183
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	227

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	228
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	229
Y155F/I251S	Y[155]F/186S	230
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	231
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	232
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	233
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233F/E240N	234
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	235
D104N/K106S/ Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	236
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	237
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/I86S//R150Y/R170E/R233E/E240N	238
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	239
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	240
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	241
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	242
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	243

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	244
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ K63N/K82N/N84S	245
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	246
D104N/K106S/Y155F/K228N/	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	247
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	248
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	184
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	249
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	250
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	251
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	252
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	253
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	254
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	255
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	256
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	257
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	258

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	259
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	260
Y155F/N260S/N346D/	Y[155]F/N95S/N178D	261
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	262
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	185
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	263
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E /R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	264
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	265
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	266
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	267
R338E/T343R	R170E/T175R	268
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	269
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	270
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	271
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]FK82N/N84S/N95S	272
Y345A	Y177A	213

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
Y345T	Y177T	214
T343R	T175R	209
T343 E	T175E	210
T343Q	T175Q	211
F342I	F174I	212
T343R/Y345T	T175R/Y177T	215
R318Y/R338E	R150Y/R170E	188
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	216
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	326
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	327
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	328
Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	329
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	330
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	331
T343R/N346Y	T175R/N178Y	332
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/E240N	333

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/ E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	334
T343R/N346D	T175R/N178D	335
R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/ E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/E240N	336
R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	337
R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/ E410N	R150Y/R170E/Y177A/N178D/R233E/E240N	338
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	339
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	340
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	341
K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	342
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	343
K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	344
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	345
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E	346
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	347
Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/E240N	348
R3 18Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	349

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
Y]55F/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E/E240N	350
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	351
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	352
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	353
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	354
K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	355
Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	356
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	357
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	358
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	359
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	360
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	361
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	362
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	363
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	364
Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	365

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	366
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	367
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	368
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	369
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E41ON	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	370
K247N/N249S/R33 8 E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	371
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	372
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R	373
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E	374
Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/E240N	375
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	376
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	377
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	378
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	379
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	380
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	381

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/E240N	382
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	383
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	384
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	385
K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	386
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	387
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	388
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	389
K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	390
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	391
K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	392
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	393
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	394
Y155F/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E	395
Y155F/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/T175R/R233E/E240N	396
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	397

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	SEQ ID NO.
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	398
Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240N	399
Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R233E/E240N	400
Y155F/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/E240N	401
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	402
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	403
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	404
K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	405
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	406
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	407
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	408
Y155F/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/R233E/E240N	409
Y155F/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E	410
Y155F/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R233E/E240N	411
Y1N	Y[1]N	412

C. Expresión y purificación de polipéptidos FIX

Los polipéptidos FIX de tipo silvestre y variantes se expresaron en células CHO-Express (CHOX) (Excellgene). Las células CHO Express (CHOX) se mantuvieron en medio completo DM204B (Irvine Scientific) y se usaron para inocular cultivos de semillas de producción. Se cultivaron cultivos de semillas en los mismos medios hasta aproximadamente 1.4 x 10^7 células viables (vc)/ml y se usaron aproximadamente 100 ml para inocular aproximadamente 1.0 l de medio DM204B completo, de modo que la densidad de inoculación fue de 1.2 x 10^6 vc/ml. Este cultivo se cultivó durante 3 días para alcanzar 13-16 x 10^6 vc/ml el día de la transfección. Se formó un complejo de transfección mezclando ADN plasmídico FIX (3.2 mg) con Polietilenimina "MAX" (PEI - 20.5 mg (Polysciences)) y diluyendo a 1.0 L con medio de transfección TfMAX2 libre de suero (Mediatech). Esta mezcla se añadió luego al cultivo de producción de 1.0 l. Partes alícuotas de 1.0 l de las células más la mezcla de transfección se dividieron en matraces Fernback desconcertados de 2 x 3 l y se dejaron que se expresaran durante 4 días antes de cosechar el FIX crudo. Los sobrenadantes de cultivo se cosecharon luego por filtración y FIX se purificó.

Se produjeron cultivos a mayor escala de 10 L o mayor en biorreactores WAVE (GE Healthcare). Se inocularon bolsas de ondas de 20 l con aproximadamente 400 ml de cultivo de semillas, cultivadas como se describió anteriormente, con 4.6 l de medio DM204B completo a una densidad de siembra de 1.2 x 10^6 vc/ml. El biorreactor WAVE se estableció en un ángulo de oscilación de 6 grados, la velocidad de 24 rpm balanceo a 37.1°C con el fin de permitir que las células alcanzan una densidad celular de 13-16x10^6 vc/ml 3 días más tarde. Se combinaron 16 mg de ADN plasmídico FIX y 102.5 mg de PEI para formar un complejo de transfección, que se diluyó en 5.0 L de TfMAX2 antes de la adición al cultivo en el biorreactor WAVE, 3 días después de la siembra inicial. Mientras que el complejo de Transfección más los medios TfMAX se agregaron a la bolsa de ondas, el ángulo de balanceo del Biorreactor WAVE se ajustó a 8 grados y la temperatura a 33°C, mientras que los otros ajustes permanecieron iguales. El cultivo se dejó expresar durante 4 días antes de cosechar el FIX crudo. Los contenidos de las bolsas de ondas se dejaron reposar durante 3 horas a 4°C antes de cosechar el sobrenadante de cultivo a través de un filtro de profundidad CUNO y luego se purificó el FIX.

Los polipéptidos FIX se purificaron usando una columna Capto Q (GE Healthcare), a la que se adsorben polipéptidos FIX con dominios Gla funcionales, seguido de una etapa de elución de calcio. Típicamente, EDTA (10 mM), Tris (25 mM, pH 8.0) y Tween-80 (0.001%) se agregaron al sobrenadante de cultivo de las células transfectadas. Las muestras se cargaron en una columna Capto Q que se había equilibrado previamente con Tampón B (Tris 25 mM pH 8, NaCl 1 M, Tween-80 al 0.001%), seguido de equilibrio con Tampón A (Tris 25 mM pH 8, 0.15 NaCl M, Tween-80 al 0.001%). Inmediatamente después de completar la carga de la muestra, la columna se lavó con tampón B al 14% (tampón A al 86%) durante 20 volúmenes de columna. Buffer C (25 mM Tris pH 8, 0.2 M NaCl, 0.001% Tween-80, 10 mM $CaCl_2$) luego se aplicó a la columna para eluir los polipéptidos FIX que se recolectaron como un grupo.

El grupo eluido se purificó adicionalmente usando una columna Q Sepharose HP (GE Healthcare). La muestra se preparó para la aplicación diluyendo con 2 volúmenes de Tampón D (Tris 25 mM pH 8, Tween-80 al 0.001%). La muestra diluida se cargó en una columna de Q Sepharose HP que había sido pre-equilibrada con tampón F (25 mM Tris pH 8, 1 M NaCl, 2.5 mM de $CaCl_2$, 0.001% de Tween-80), seguido de Buffer E (25 mM Tris pH 8, 2.5 mM de $CaCl_2$, 0.001% de Tween-80). Después de lavar con 4% de Tampón F (96% de Tampón E), se aplicó un gradiente de 4-40% de Tampón F a la columna y se recogieron las fracciones. Las fracciones que contenían polipéptidos FIX se agruparon.

D. Purificación para enriquecer los polipéptidos glicosilados.

El grado de glicosilación de los polipéptidos FIX modificados se estimó usando electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. La hiperglucosilación se evaluó mediante la comparación del patrón de migración del polipéptido FIX modificado con un FIX de tipo silvestre, Benefix® Coagulation FIX. Las formas hiperglucosiladas de la enzima migraron más lentamente, exhibiendo un peso molecular aparente más alto, que el polipéptido de tipo silvestre. Se observó que los polipéptidos que contenían la mutación E240N, que introduce un sitio de N-glicosilación no nativo en la posición 240, solo estaban parcialmente glicosilados (aproximadamente 20% de glicosilación). Para enriquecer la forma hiperglucosilada, se realizó una modificación del proceso de purificación descrito anteriormente.

El primer paso de purificación se realizó usando la columna Capto Q, como se describió anteriormente. El grupo eluido de esta columna se diluyó con 2 volúmenes de Tampón D (como se describió anteriormente) y la muestra se cargó en una columna de Heparin Sepharose que se había equilibrado previamente con Tampón F (como se describió anteriormente), seguido de Tampón E (como se describió anteriormente). La columna se desarrolló luego con un gradiente de 0% a 70% de tampón F y se recogieron las fracciones. La forma hiperglucosilada de la variante E410N eluyó de la columna en aproximadamente el 35% de tampón F, mientras que la forma no hiperglucosilada eluyó en aproximadamente el 50% de tampón F. Cada grupo recogido se purificó adicionalmente en la columna Q Sepharose HP como se describió anteriormente. Mediante este método, se obtuvo un conjunto que contenía aproximadamente un 80% de forma hiperglucosilada de la variante E410N. El grado de hiperglucosilación se estimó mediante inspección visual de la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Ejemplo 2.

Activación de FX y determinación de la concentración de proteasa catalíticamente activa (FXa) usando el valorante de sitio activo de fluoresceína-mono-*p'*-guanidinobenzoato (FMGB)

La concentración de factor X (FX) en una reserva de FX que se puede determinar catalíticamente activo. Esta reserva de FX se utilizó en estudios posteriores para calcular la actividad catalítica de las variantes de FIX para FX. Después de la activación de FX a FXa, el ensayo de titulación del sitio activo se llevó a cabo esencialmente según lo descrito por Bock et al. (Archives of Biochemistry and Biophysics (1989) 273: 375-388) usando el sustrato de éster fluorogénico fluoresceína-mono-*p'*-guanidinobenzoato (FMGB), con algunas modificaciones menores. FMGB reacciona fácilmente con FXa, pero no FX o proteasa inactiva, para formar un intermediario acil-enzima eficazmente estable en condiciones en las que la concentración de FMGB es saturante y la desacilación es especialmente lenta y limita la velocidad de catálisis. En estas condiciones, la proteasa FXa experimenta una renovación catalítica única para liberar el fluoróforo de fluoresceína. Cuando la estallido inicial de fluorescencia se calibra a una curva estándar de concentración externa de fluorescencia de fluoresceína, se puede calcular la concentración de sitios activos.

A. Activación de FX a FXa

La concentración de FX en una solución madre que puede volverse catalíticamente activa se determinó mediante la activación de muestras de FX con Veneno de Víbora de Rusell, seguido de la valoración del FX activo (FXa) con FMGB. Las reservas de zimógeno FX fueron tratadas previamente por el proveedor con DFP (diisopropilfluorofosfato) y EGR-cmk para reducir la actividad de fondo FXa. Las reacciones de activación de FXa se prepararon con una concentración final de FX 10 μM (basada en la absorbancia A_{280} y un coeficiente de extinción de 1.16) en un volumen final de 50 - 100 μl en un tampón de reacción que contenía Tris 100 mM, 50 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0.1% PEG 8000, pH 8.1. La activación se inició mediante la adición de Veneno de Víbora de Russell (RVV-Xasa; Heamatologic Technologies, Inc.) a una concentración final de 5 μg/ml (5 μl de una dilución de 98 μg/ml por 100 μl de reacción o 2.5 μl por 50 μl reacción) a 37°C durante 45-60 minutos de tiempo de activación (previamente determinado para representar la activación completa al recolectar muestras cada 15 minutos y probar el aumento en la división del sustrato fluorogénico Spectrafluor FXa). Las reacciones se enfriaron con 1/10 de volumen de tampón de enfriamiento que contenía Tris 100 mM, NaCl 50 mM, 5 mM, EDTA 100 mM, PEG 8000 al 0.1%, pH 8.1.

B. Titulación activa del sitio.

Se realizaron ensayos de titulación de sitio activo con un volumen de reacción de 1 ml en una cubeta de cuarzo de 0.4 cm x 1 cm con agitación continua. Las reacciones contenían 100-400 nM del FXa recién activado y 5 μM de FMGB en un tampón de ensayo que contenía Hepes 30 mM, NaCl 135 mM, EDTA 1 mM y PEG 8000 al 0.1%, pH 7.4. El FMGB se preparó a una concentración de reserva de 0.01 M en DMF basado en el peso seco y la concentración confirmada por espectroscopía de absorbancia a 452 nm usando un coeficiente de extinción de 19.498 M^{-1} cm^{-1} en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.2. Los ensayos se iniciaron mediante la adición de 5 μl de FMGB 1 mM (5 μM de concentración final) a 1 ml de 1 x tampón de ensayo y primera medición de la hidrólisis de fondo de FMGB para ~150-200 segundos antes de la adición de FXa a una concentración final de ~100-400 nM. Se siguió la liberación de fluoresceína fluorescente en la fase de estallido de la reacción durante 3600 segundos adicionales.

La cantidad de fluoresceína liberada después de la catálisis de FMGB por FXa se determinó usando una curva estándar de fluoresceína libre. La solución estándar de fluoresceína se preparó recientemente a una concentración de reserva de ~70-150 mM en DMF y la concentración precisa se confirmó mediante espectroscopía de absorbancia en condiciones estándar a 496 nm utilizando un coeficiente de extinción de 89.125 M^{-1} cm^{-1} en NaOH 0.1 N. Luego se preparó una curva estándar de fluoresceína libre por valoración del estándar de fluoresceína calibrado con absorbancia en tampón de ensayo 1x en pasos de 20 nM a una concentración final de 260-300 nM.

Para el análisis de datos, se importaron trazas de reacción en el paquete de software Graphpad Prism y la contribución de la hidrólisis de fondo se restó de la curva mediante extrapolación de la tasa medida inicial de hidrólisis espontánea de FMGB, que típicamente era menos del 5% del total de estallido de fluorescencia. La curva corregida se ajustó a una ecuación exponencial única con un componente lineal (para tener en cuenta la lenta tasa de desacilación) de la forma ΔFluorescencia = Amp(l-e^{-kt})+B*t,* donde Amp = la amplitud de la fase de estallido en las condiciones de ensayo de saturación descritas anteriormente, k es la constante de velocidad de primer orden observada para la formación de acil-enzima y B es una constante de velocidad masiva asociada con la renovación completa de FMGB. La concentración de la proteasa FXa activa se calculó comparando el parámetro de ajuste de amplitud con la curva estándar de fluoresceína. Los valores de múltiples ensayos se midieron, promediaron y se determinó la desviación estándar. La cantidad de FXa activo en la preparación representa directamente la concentración de FX en una preparación de stock que puede ser activada por FIXa. Este valor titulado en el sitio activo se empleó al calcular la concentración de FX a utilizar en un ensayo indirecto, tal como el ensayo dependiente de cofactor descrito en el Ejemplo 4, a continuación.

Ejemplo 3.

La activación de FIX y Determinación de la concentración catalíticamente activo de la proteasa (FIXa), utilizando el valorante de sitio activo de 4-metilumbeliferil*p'-guanidinobenzoato* (MUGB)

La concentración de Factor IX (FIX) en una solución madre de la FIX El zimógeno que puede volverse catalíticamente activo se determinó mediante la activación de muestras FIX, incluidas las variantes FIX, con Factor XIa (FXIa; Heamatologic Technologies, Inc.), seguido de la valoración del Factor IX activo (FIXa) con 4-metilumbeliferil *p*'-guanidinobenzoato (MUGB)

A. Activación de FIX a FIXa

Las concentraciones totales de proteína en las preparaciones de polipéptidos FIX se determinaron mediante la absorbancia A_{280} usando un coeficiente de extinción único para cada variante (es decir, ε_{280} = número de residuos Tyr x 1490 + número de residuos Trp × 5500 + número de residuos Cys × 125). Se prepararon reacciones de activación de FIX a FIXa a una concentración final de 10 μM FIX en un volumen final de 200 - 500 μl en una reacción de tampón que contiene Tris 100 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 5 mM, 0.1% de PEG 8000, pH 8.1. Las activaciones se iniciaron mediante la adición de FXIa o FXIa biotinilado a una concentración final de 20 nM a 37°C durante 60 minutos de tiempo de activación. Se determinó previamente un tiempo de activación de 60 minutos para representar la activación completa mediante la recolección de muestras cada 15 minutos y el ensayo de división total por SDS-PAGE.

El FXIa libre o FXIa biotinilado usado en la reacción de activación se eliminó de las muestras usando uno de los dos métodos que producen resultados equivalentes, cada uno eliminando más del 95-97% del FXIa catalítico. En el primer método, que se utilizó para eliminar FXIa libre, las reacciones de activación iniciadas con FXIa se mezclaron con un anticuerpo monoclonal anti-FXIa (Abcam 20377) a una concentración final de 50 nM durante 60 minutos a 37°C. La captura de anticuerpos de FXIa libre fue seguida por la adición de Perlas Dynal de proteínas G lavadas (30 mg/ml; Invitrogen) a una concentración final de 25% vol:vol durante 120 minutos adicionales a temperatura ambiente. Las Perlas Dynal se eliminaron de la solución según las instrucciones del fabricante. En el segundo método, que se usó para eliminar FXIa biotinilado, las reacciones de activación usando FXIa biotinilado se mezclaron con Perlas Dynal de Estreptavidina (10 mg/ml; Invitrogen) a una concentración final de 10% vol:vol durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las Perlas Dynal se eliminaron según las instrucciones del fabricante. Después de la eliminación del FXIa, las concentraciones totales de proteína de las muestras activadas de FIXa se determinaron mediante la absorbancia A_{280} utilizando un coeficiente de extinción único para cada variante (como se describió anteriormente).

B. Valoración de sitio activo de FIXa

La concentración de FIXa catalíticamente activa en una solución madre activada se determinó titulando las muestras de FIXa con un sustrato de éster fluorogénico, 4-metilumbeliferil *p*'-guanidinobenzoato (MUGB). El ensayo de titulación principal se realizó esencialmente como se describe por Payne et al. (Biochemistry (1996) 35: 7100-7106) con algunas modificaciones menores para explicar la reactividad más lenta de MUGB con FIXa. MUGB reacciona fácilmente con FIXa, pero no con FIX o proteasa inactiva, para formar un intermediario acil-enzima eficazmente estable en condiciones en las que la concentración de MUGB es saturante y la desacilación es especialmente lenta y limita la velocidad de catálisis. En estas condiciones, la proteasa FIXa experimenta una renovación catalítica única para liberar el fluoróforo de 4-metilumbeliferona (4-MU). Cuando la estallido inicial de fluorescencia se calibra a una curva estándar de concentración externa de fluorescencia 4-MU, se puede calcular la concentración de sitios activos.

Los ensayos se realizaron con un volumen de reacción 1 ml de una cubeta de cuarzo 0.4 cm x 1 cm, bajo agitación continua con un tampón de ensayo que contiene HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 5 mM y 0.1% de PEG 8000, pH 7.6. Se preparó MUGB a una concentración de reserva de 0.04 M en DMSO en base al peso seco y se diluyó a una concentración de trabajo de 2 mM en DMSO. Los ensayos de titulación se iniciaron agregando 4 μL de MUGB 2 mM a una concentración final de 8 μM en 1 × tampón de ensayo y midiendo primero la hidrólisis de fondo de MUGB durante - 200 - 300 segundos antes de la adición de la variante FIXa o FIXa a una final concentración de 100 - 200 nM basada en la concentración de proteína total determinada para la reacción de activación después de la eliminación de FXIa. Se siguió la liberación de fluorescencia 4-MU en la fase de estallido de la reacción durante un total de 2 horas para adquirir datos suficientes de la estallido inicial y las fases de estado estacionario posteriores.

La cantidad de 4-MU liberada después de la catálisis de MUGB por FIXa se determinó usando una curva estándar de 4-MU. Se preparó una solución estándar de 4 MU a una concentración de reserva de 0.5 M en DMSO y se confirmó la concentración mediante espectroscopía de absorbancia a 360 nm usando un coeficiente de extinción de 19,000 M^{-1} cm^{-1} en tampón Tris 50 mM, pH 9.0. La curva estándar de 4-MU libre se preparó mediante la valoración del 4-MU calibrado con absorbancia en 1 × tampón de ensayo en pasos de 20 nM a una concentración final de 260 -300 nM de 4-MU.

Para el análisis de datos, se importaron trazas de reacción en el paquete de software Graphpad Prism y la contribución de la hidrólisis de fondo se restó de la curva por extrapolación de la tasa medida inicial de hidrólisis espontánea de MUGB, que típicamente era menos del 5% del total de estallido de fluorescencia. La curva corregida se ajustó a una ecuación exponencial única con un componente lineal (para tener en cuenta la tasa lenta de desacilación en la fase de estado estable) de la forma ΔFluorescencia = Amp $(1-e^{-kt})+Bt$, donde Amp = el amplitud de la fase de ruptura bajo las condiciones de ensayo de saturación descritas anteriormente, k es la constante de velocidad de primer orden observada para la formación de acil-enzima y B es una constante de velocidad masiva asociada con el recambio completo de

MUGB. La concentración de la proteasa FIXa activa se calcula comparando el parámetro de ajuste de amplitud con la curva estándar de 4-MU. Los valores de múltiples ensayos se midieron, promediaron y se determinó la desviación estándar. La concentración de zimógeno FIX, que puede activarse, en una solución madre se determinó multiplicando la A_{280} concentración total determinada del zimógeno FIX por el valor activo de la fracción determinada experimentalmente para la muestra completamente activada (concentración de FIXa activo/concentración total de FIXa).

Ejemplo 4.

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

La actividad catalítica de las variantes de FIXa para el sustrato, factor X (FX), se evaluó indirectamente en un ensayo fluorogénico analizando la actividad de FXa, generado tras la activación por FIXa, en el sustrato sintético Spectrafluor FXa. Se usó un rango de concentraciones de FX para calcular las constantes de velocidad cinética donde la proteasa de sustrato (FX) estaba en exceso al menos 1000 veces sobre la concentración de la proteasa activadora (FIXa). Brevemente, el FIXa titulado en el sitio activado y activo se incubó en un tampón que contiene calcio con FVIII recombinante, vesículas de fosfolípidos y alfa-trombina (para activar FVIII a FVIIIa), formando el complejo tenasa (Xasa). La actividad de la alfa-trombina se extinguió mediante la adición de un inhibidor de trombina altamente específico, la hirudina, antes de iniciar el ensayo. Las variantes de FIXa (como parte del complejo Xasa) se mezclaron posteriormente con diversas concentraciones de FX y el sustrato fluorescente, Spectrafluor FXa (CH_3SO_2-D-CHA-Gly-Arg-AMC) para iniciar el ensayo. La liberación del fluoróforo libre, AMC (7-amino-4-metilcumarina) después de la catálisis de Spectrafluor FXa por FXa se evaluó continuamente durante un período de tiempo, y se determinaron las constantes de velocidad cinética de las variantes de FIXa.

A. Protocolo de ensayo

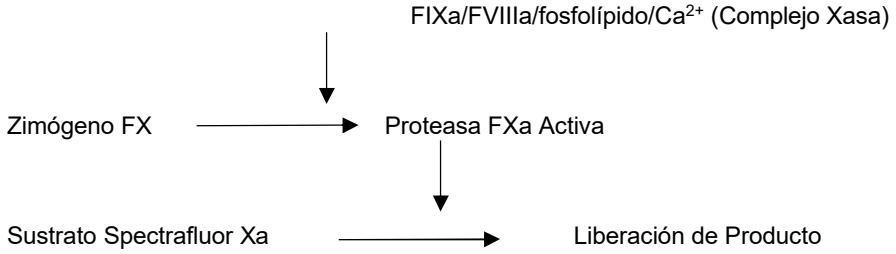
Para los ensayos que evalúan la velocidad cinética de activación de FX por FIXa en presencia de FVIIIa y fosfolípidos, el FVIII recombinante (Kogenate FS®; Bayer healthcare) se resuspendió primero en 5 ml del diluyente proporcionado según instrucciones del fabricante. La concentración molar de FVIII se determinó luego por absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 1.567 mg^{-1} ml cm^{-1} y un peso molecular de 163.6 kDa. Las variantes FIX se expresaron, purificaron, activaron y valoraron en el sitio activo como se describe en los Ejemplos 1-3 anteriores. Las variantes de FIXa se diluyeron en serie a una concentración de 16 pM en un volumen de 200 μL de 1 × Tampón A (Hepes 20 mM/NaCl 150 mM/$CaCl_2$ 5 mM/0.1% BSA/PEG-8000 al 0.1%, pH 7.4). En preparación para la activación de FVIII a FVIIIa en presencia de FIXa y fosfolípidos, se diluyeron alfa-trombina (Heamatologic Technologies, Inc.) e hirudina (American Diagnostica) en un volumen de 1.0 ml de 1 × Tampón A a 64 nM y 640 nM, respectivamente. El FVIII reconstituido se diluyó adicionalmente a una concentración de 267 nM en un volumen de 10 ml de 1 x tampón A que contenía fosfolípidos recién resuspendidos 267 μM (fosfatidilcolina (PC) al 75%/fospatidilserina (PS) al 25%; vesículas PS/PC ~120 nm de diámetro); Avanti Polar Lipids). El FVIII se activó a FVIIIa mezclando 600 μL de la solución FVIII/PC/PS anterior con 100 μL de la dilución variante FIXa o FIXa de tipo silvestre 16 pM y 50 μL de la solución de alfa-trombina 64 nM seguido de 15 minutos de incubación a 25°C. Las reacciones de activación se extinguieron posteriormente mediante la adición de 50 μL de la solución de hirudina 640 nM anterior durante 5 minutos a 25°C antes de iniciar el ensayo cinético para la activación de FX. La concentración final de reactivos en las soluciones del complejo Xasa de 800 μL fue la siguiente: variante FIXa 2 pM, FVIIIa 200 nM, vesículas PC/PS 200 μM, alfa-trombina 4 nM (inhibida) y hirudina 40 nM.

Un total de 25 μl de cada solución de complejo Xasa se dividió en partes (FIXa/FVIIIa/Fosfolípidos/Ca^{2+}) alícuotas en una placa de ensayo negra de media área de 96 pozos de acuerdo con un mapa de placa predefinido (4 variantes/placa de FIXa). Se preparó una solución de FX titulada en el sitio activo 900 nM y tratada con DFP/EGR-cmk (véase el ejemplo 2, más arriba) en 5.6 ml de 1 × tampón A que contenía sustrato Spectrafluor Xa 1.0 mM. Esto representaba la concentración más alta de FX probada y un volumen suficiente para 4 ensayos. La solución FX/Spectrafluor Xa se diluyó luego en serie 1.8 veces en una placa de polipropileno de 8 canales con pozos profundos con un volumen final de 2.5 ml 1 × Tampón A que contiene Spectrafluor Xa 1.0 mM, lo que resulta en diluciones finales de 900 nM, 500 nM, 277.8 nM, 154.3 nM, 85.7 nM, 47.6 nM, 25.6 nM y 0 nM FX. Alternativamente, en algunos ensayos, la solución FX/Specrafluor Xa se diluyó en serie 1.5 veces en una placa de polipropileno de pozo profundo de 12 canales con un volumen final de 2.5 ml 1 × Tampón A que contiene Spectrafluor Xa 1.0 mM, lo que resulta en diluciones finales de 900 nM, 600 nM, 400 nM, 266.7 nM, 177.8 nM, 118.5 nM, 79.0 nM, 52.7 nM, 35.1 nM, 23.4 nM, 15.6 nM y 0 nM FX. Las reacciones de ensayo se iniciaron típicamente usando un sistema de manejo de líquidos BioMek FX programado para dispensar 25 μL de las diluciones FX/Spectrafluor Xa en 4 placas de ensayo que contienen 25 μL de cada variante FIXa (complejo Xasa). Las concentraciones finales de los reactivos en el ensayo fueron las siguientes: FIXa 1 pM, FVIIIa 100 μM, vesículas PC/PS 100 μM, Spectrafluor Xa 0.5 mM, alfa-trombina 2 nM (inhibida), hirudina 20 nM y diluciones FX de 0 nM a 450 nM. Las reacciones se monitorizaron en un lector de placa de fluorescencia SpectraMax durante 30 minutos a 37°C. Una curva estándar de AMC libre sirvió como factor de conversión para RFU a μM en los cálculos de análisis de datos posteriores utilizando un rango de dosis que cubría de 0 μM a 100 μM de AMC.

B. Análisis de datos

Todas las ecuaciones utilizadas para determinar la cinética de estado estable de la catálisis de FX por FIXa se basan en las descritas en la referencia “Zymogen-Activation Kinetics: Modulatory effects of trans-4-(aminomethyl)cyclohexane-lcarboxylic acid and poly-D-lysine on plasminogen activation” en Petersen, et al. (1985) Biochem. J. 225: 149-158. La teoría de la cinética de estado estacionario del sistema descrito por el Esquema A (ver más abajo) se describe mediante la expresión de la ecuación (1) que representa una acumulación parabólica de producto.

Esquema A:



De acuerdo con el mecanismo del Esquema A, a_0 es la concentración de proteasa activadora (FIXa), z_0 es la concentración de zimógeno (FX), k_a y K_z representan el k_{cat} y K_M para el activador. conversión catalizada de zimógeno a enzima activa (FXa), mientras que k_e y K_s representan el k_{cat} y K_M para la conversión de sustrato a producto por FXa durante un tiempo dado t:

Ecuación (1)

$$p = a_0 \frac{k_a[z_0]}{K_z + [z_0]} * \frac{k_e[S_0]}{K_s + [S_0]} * \frac{t^2}{2}$$

Para el análisis de las curvas de progreso, la ecuación (1) fue reformulada en forma de ecuación (2) donde la cinética en estado estacionario de la hidrólisis FXa del sustrato fluorogénico se determinó de forma independiente y se reemplazó por la constante compuesta k_2.

Ecuación (2)

$$p = a_0 \frac{k_a[z_0]}{K_z + [z_0]} * k_2 * \frac{t^2}{2}$$

La actividad FXa en Spectrofluor FXa en 1 x Tampón A se determinó independientemente que tenía una K_M de 313.0 μM y un valor de k_{cat} de 146.4 s^{-1}. La sustitución de estos valores en la ecuación (3) dio un k_2 factor de corrección de 90 s^{-1}.

Ecuación (3)

$$k_2 = \frac{k_e[S_0]}{K_M + [S_0]}$$

Para determinar el grado de actividad catalítica de FIXa, los datos sin procesar recopilados con la aplicación SoftMax Pro (dispositivos moleculares) se exportaron como archivos .XML o archivos .TXT. Se realizaron análisis de datos no lineales adicionales con XLfit4, un paquete de software para ajuste automático de curvas y análisis estadístico dentro del entorno de hoja de cálculo de Microsoft Excel (software IDBS) o directamente dentro del paquete de software ActivityBase utilizando el módulo de análisis de datos XE Runner (software IDBS). La plantilla de hoja de cálculo se configuró para ajustarse automáticamente a las velocidades de reacción parabólica (μM/s^2) de las variantes de FIXa probadas en cada concentración de FX a la función de una hipérbola rectangular estándar (es decir, la ecuación de Michaelis Menten) dada por la ecuación (4) para obtener los valores de ajuste para $V_{máx}$ y K_M.

Ecuación (4)

$$Velocidad\ de\ Reacción\ (\mu M/s^2) = \frac{V_{máx}[S_0]}{K_M + [S_0]}$$

El valor de k_{cat} para la variante FIXa probada se calculó a partir del valor de ajuste para $V_{máx}$ ($\mu M/s^2$) mediante la ecuación (5).

Ecuación (5)

$$k_{cat} = \frac{V_{máx}}{[FIXa] * 0.5 * k_2}$$

La constante de especificidad k_{cat}/K_M se calculó directamente a partir del valor de ajuste de K_M y el k_{cat} calculado que surgió de la evaluación de la ecuación (5) anterior.

Las tablas 14-19 exponen la actividad catalítica para cada una de las variantes de FIXa ensayadas. También se analizaron FIXa de tipo silvestre recombinante (denominado Catalyst Biosciences WT; generado como se describió anteriormente en el Ejemplo 1), FIXa purificado por plasma (Haematologic Technologies, Inc.) y BeneFIX® (Factor IX de coagulación (Recombinante); Wyeth). Las tablas 14-15 presentan los resultados expresados como la constante cinética para la actividad catalítica, k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$), y también como el porcentaje de la actividad del FIXa de tipo silvestre, en el que la actividad es actividad catalítica, k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) de cada variante FIXa para su sustrato, FX. Las constantes de velocidad individuales k_{cat} y K_M se proporcionan en las Tablas 16-17 y 18-19, respectivamente. Las tablas 15, 17 y 19 reflejan datos para variantes FIXa adicionales y proporcionan nuevos promedios globales calculados para incluir réplicas experimentales adicionales (n) para variantes FIXa en las tablas 14, 16 y 18. Donde la actividad de la variante FIXa se comparó con la de tipo silvestre FIXa, se comparó con un polipéptido FIXa de tipo silvestre recombinante que se expresó y purificó usando las mismas condiciones que las utilizadas para los polipéptidos FIXa variantes para asegurar que cualquier diferencia en la actividad fuera el resultado de la mutación (es), y no el resultado de diferencias en, por ejemplo, modificaciones postraduccionales asociadas con diferentes sistemas de expresión. Por lo tanto, el polipéptido FIXa de tipo silvestre utilizado para la comparación fue el FIXa recombinante de tipo silvestre generado a partir de la clonación del gen FIX establecido en SEQ ID NO: 1 y expresado a partir de células CHOX como un polipéptido con una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3, como se describe en el Ejemplo 1 (es decir, polipéptido Catalyst Biosciences WT FIX). La desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (como porcentaje;% CV) y el número de ensayos realizados (n) también se proporcionan para cada parámetro cinético.

Las actividades catalíticas observadas de las variantes de FIXa variaron desde una actividad de Xasa no detectable en algunas variantes (por ejemplo, FIXa-F314N/H315S, FIXa-G317N, FIXa-R318N/A320S y FIXa-K400F/R403F) a un aumento de más de 10 veces en k_{cat}/K_M para la activación de FX en comparación con FIXa de tipo silvestre. Algunas de las variantes mostraron una actividad catalítica notablemente aumentada en comparación con el tipo natural FIXa, incluidos FIXa-R338E, FIXa-R338A, FIXa-T343R, FIXa-E410N y combinaciones de los mismos, como FIXa-R318Y/R338E/E410N, FIXa-R318Y/R338E/R402E/E410N, FIXa-R318Y/R338E/T343R/R402E/E410N, FIXa-R318Y/R338E/T343R/E410N y FIXa-R338E/T343R mostraron algunos de los mayores aumentos en la actividad catalítica. Aunque varias variantes de FIXa con sitios de glucosilación adicionales únicos o múltiples demostraron actividad cercana al tipo silvestre (por ejemplo, FIXa-I251S, FIXa-D85N/I251S, FIXa-K63N, FIXa-K247N/N249S y FIXa-K63N/K247N/N249S) o mejoraron actividad cuando se combina con otras mutaciones (por ejemplo, FIXa-K247N/N249S/R338E/T343R/R403E y FIXa-K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N), otras mostraron actividad catalítica reducida. La actividad catalítica aumentada se debió a mejoras en k_{cat} o K_M o, más a menudo, en ambos parámetros.

Tabla 14. Actividad catalítica de las variantes de FIXa (k_{cat}/K_M)

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	% de WT k_{cat}/K_M	n
BeneFIX Benefix® FIX de Coagulación(T148A)	BeneFIX Benefix® FIX de Coagulación(T [148] A)	4.1E+07	2.1E+07	51%	91%	125
FIXa purificada por plasma	FIXa purificada por plasma	5.2E+07	2.2E+07	41%	117%	120
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	4.5E+07	2.5E+07	56%	100%	31
N157D	N[157]D	2.9E+07	8.1E+06	28%	64%	2
Y155F	Y[155]F	4.1E+07	1.3E+05	0%	93%	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	3.9E+07	1.4E+06	4%	88%	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	3.6E+07	1.0E+06	3%	81%	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	3.7E+07	1.4E+07	38%	82%	9
D I04N/KI06S	D[104]N/K[106]S	3.8E+07	1.3E+07	34%	86%	9
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	2.8E+07	6.7E+06	24%	62%	7
D85N	D[85]N	7.3E+07	2.8E+07	38%	164%	15
T148A	T[148]A	4.0E+07	2.5E+07	62%	89%	30
T148A†	T[148]A†	2.3E+07	7.6E+06	33%	52%	7
K5A	K[5]A	5.6E+07	4.5E+06	8%	125%	2
D64N	D[64]N	1.0E+07	1.9E+06	19%	22%	2
D64A	D[64]A	2.5E+06	1.1E+06	47%	5%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	% de WT k_{cat}/K_M	n
N167D	N[167]D	3.1E+07	1.1E+07	34%	69%	2
N167Q	N[167]Q	3.5E+07	1.9E+07	53%	79%	4
S61A	S[61]A	4.8E+07	2.5E+07	52%	108%	4
S53A	S[53]A	3.5E+07	1.7E+07	48%	78%	3
T159A	T[159]A	3.7E+07	1.2E+07	33%	82%	3
T169A	T[169]A	4.7E+07	2.0E+07	43%	106%	3
T172A	T[172]A	5.0E+07	2.6E+07	52%	112%	3
T179A	T[179]A	5.5E+07	1.3E+07	23%	122%	3
Y155H	Y[155]H	5.0E+07	1.4E+07	27%	113%	3
Y155Q	Y[155]Q	5.4E+07	2.0E+07	36%	121%	3
S158A	S[158]A	3.6E+07	1.1E+06	3%	81%	2
S158D	S[158]D	4.0E+07	9.3E+05	2%	89%	2
S158E	S[1581E	3.7E+07	3.5E+06	9%	82%	2
N157Q	N[157]Q	3.2E+07	2.8E+06	9%	72%	2
D203N/F205T	D39N/F41T	2.2E+07	1.2E+07	53%	50%	12
D85N/D203N/F205T	D[851N/D39N/F41T	3.0E+07	6.4E+06	22%	66%	5
K228N	K63N	3.6E+07	1.7E+07	49%	80%	13

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	% de WT k_{cat}/K_M	n
D85N/K228N	D[85]N/K63N	4.6E+07	1.5E+07	32%	104%	6
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	2.9E+07	1.0E+07	35%	64%	3
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	2.6E+07	7.6E+06	29%	59%	3
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	4.5E+07	2.4E+06	5%	101%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	5.9E+07	1.1E+07	19%	132%	2
1251S	I86S	5.9E+07	1.2E+07	21%	132%	13
D85N/I251S	D[85]N/I86S	5.6E+07	1.1E+07	20%	124%	5
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	3.3E+07	6.4E+06	19%	75%	5
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	3.9E+07	2.6E+07	67%	87%	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/186S	2.9E+07	1.1E+06	4%	66%	2
Y155F/I251S	Y[155]F/186S	6.7E+07	5.9E+06	9%	149%	2
A262S	A95bS	2.4E+07	1.0E+07	42%	54%	8
K413N	K243N	2.9E+07	1.7E+07	58%	64%	5
E410N	E240N	1.3E+08	8.6E+07	65%	297%	21
E410N*	E240N*	3.0E+07	1.1E+07	36%	66%	11
E239N	E74N	2.0E+07	1.1E+07	58%	44%	9
T241N/H243S	T76N/H78S	1.9E+07	5.7E+05	3%	42%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	% de WT k_{cat}/K_M	n
K247N/N249S	K82N/N84S	5.4E+07	1.7E+07	32%	122%	11
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	5.1E+07	9.6E+06	19%	113%	4
A103N/N105S/K247N/ N249S	A[103]N/N(105]S/K82N/N84S	4.0E+07	5.2E+06	13%	90%	6
D104N/K106S/K247N/ N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	3.2E+07	3.3E+06	10%	72%	2
D104N/K106S/Y155F/ K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	3.2E+07	1.1E+07	36%	71%	3
L321N	L153N	1.6E+07	2.0E+06	13%	35%	2
F314N/H315S	F145N/H147S	Actividad	n.d.	n.d.	0%	4
S319N/L321S	S151N/L153S	2.8E+07	2.2E+07	78%	64%	3
N260S	N95S	1.8E+07	1.2E+07	66%	39%	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	1.3E+07	6.6E+06	51%	29%	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	1.9E+07	1.6E+07	83%	43%	2
D104N/K106S/Y155F/ N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	4.3E+06	2.0E+06	46%	10%	2
Y284N	Y117N	3.5E+07	1.5E+07	42%	78%	8
G317N	G149N	Actividad	n.d.	n.d.	0%	5
R318N/A320S	R150N/A152S	Sin Actividad	n.d.	n.d.	0%	8
R318A	R150A	4.9E+07	7.4E+06	15%	108%	3
R318E	R150E	1.7E+07	4.2E+06	25%	38%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	% de WT k_{cat}/K_M	n
R318Y	R150Y	7.0E+07	7.0E+06	10%	156%	3
R312Q	R143Q	1.1E+07	1.8E+06	17%	23%	3
R312A	R143A	4.6E+06	9.3E+05	20%	10%	2
R312Y	R143Y	1.2E+07	4.2E+06	36%	27%	2
R312L	R143L	2.4E+07	9.4E+06	39%	54%	2
V202M	V38M	6.6E+07	2.6E+07	39%	148%	2
V202Y	V38Y	2.5E+07	1.6E+06	6%	56%	2
D203M	D39M	4.5E+07	1.9E+07	42%	101%	5
D203Y	D39Y	3.0E+07	2.8E+06	9%	67%	4
A204M	A40M	1.8E+07	1.2E+07	67%	40%	5
A204Y	A40Y	4.6E+07	7.6E+06	16%	103%	2
K400A/R403A	K230A/R233A	5.3E+06	6.9E+05	13%	12%	2
K400E/R403E	K230E/R233E	Sin Actividad	n.d.	n.d.	0%	4
R403A	R233A	1.4E+07	3.0E+06	22%	31%	7
R403E	R233E	5.5E+06	I.5E+06	28%	12%	6
K400A	K230A	2.0E+07	3.1E+06	16%	44%	2
K400E	K230E	9.5E+06	1.1E+06	12%	21%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	% de WT k_{cat}/K_M	n
K293E	K126E	8.1E+06	5.4E+05	7%	18%	2
K293A	K126A	2.1 E+07	4.4E+06	21%	46%	2
R333A	R165A	Sin Actividad	n.d.	n.d.	0%	2
R333E	R165E	Actividad	n.d.	n.d.	0%	2
R338A	R170A	1.6E+08	2.5E+07	15%	361%	2
R338E	R170E	1.8E+08	8.3E+07	45%	408%	10
R338A/R403A	R170A/R233A	5.3E+07	1.3E+07	24%	119%	6
R338E/R403E	R170E/R233E	6.2E+07	8.8E+06	14%	138%	2
K293A/R403A	K126A/R233A	5.7E+06	1.4E+06	25%	13%	2
K293E/R403E	K126E/R233E	1.3E+06	8.5E+04	6%	3%	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	2.5E+07	9.5E+06	39%	55%	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	1.7E+07	5.7E+05	3%	37%	2
R318A/R403A	R150A/R233A	1.5E+07	1.3E+06	9%	33%	2
R318E/R403E	R150E/R233E	1.2E+06	3.8E+05	33%	3%	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	7.5E+07	2.7E+07	35%	168%	21
R338E/E410N	R170E/E240N	4.6E+08	1.7E+08	38%	1018%	8
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	7.8E+07	3.7E+07	47%	175%	7

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	% de WT k_{cat}/K_M	n
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	6.5E+07	4.6E+06	7%	145%	2
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	1.4E+07	2.5E+06	18%	31%	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	4.2E+07	1.7E+07	40%	94%	6
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	1.0E+08	2.3E+07	22%	234%	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	6.2E+07	1.4E+07	22%	139%	3
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	2.0E+07	2.5E+06	12%	45%	4
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	1.9E+07	4.8E+06	25%	42%	2
K228N/E410N	K63N/E240N	8.5E+07	3.4E+07	40%	190%	10
K228N/R338E	K63N/RI70E	2.1E+08	6.IE+07	29%	469%	2
K228N/R338A	K63N/R170A	2.1E+08	4.6E+07	22%	473%	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	4.7E+07	6.5E+06	14%	105%	5
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	4.8E+07	8.6E+06	18%	108%	2
R403E/E410N	R233E/E240N	2.1E+07	1.7E+06	8%	47%	2
R318Y/R338E/E410N	R150YYR170E/E240N	3.4E+08	1.4E+08	39%	770%	26
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	2.6E+08	5.9E+07	23%	581%	4
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	3.7E+08	1.3E+08	33%	835%	5
K228N/R318 Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	1.2E+08	2.6E+07	22%	272%	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	% de WT k_{cat}/K_M	n
R3I8Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	2.7E+07	3.8E+06	]4%	59%	3
R318Y/R338E/R403E/ E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	1.2E+08	8.1E+07	69%	262%	14
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.5E+08	7.3E+07	50%	327%	5
DI04N/KI06S/R3I8Y/R338E/R403E/E410N	D[1041N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.7E+08	7.9E+07	47%	377%	3
YI55F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.9E+08	5.0E+07	27%	418%	4
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.3E+08	1.8E+06	1%	283%	2
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.8E+08	9.1E+06	5%	394%	2
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	3.9E+07	2.0E+07	52%	88%	6
R333S	R165S	1.1E+05	5.5E+04	51%	0.2%	3
R338L	R170L	2.0E+08	2.3E+07	11%	444%	3
K316N	K148N	6.2E+06	4.2E+06	69%	14%	3
K316A	K148A	6.1 E+06	8.2E+05	13%	14%	3
K316E	K148E	7.1E+05	1.4E+05	19%	2%	3
K316S	K148S	3.9E+06	6.2E+05	16%	9%	3
K316M	K148M	3.1E+07	1.4E+07	46%	70%	3
E239S	E74S	3.4E+07	1.8E+07	52%	75%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	% de WT k_{cat}/K_M	n
E239A	E74A	4.9E+07	6.2E+06	13%	110%	3
E239R	E74R	5.6E+07	1.1E+07	19%	126%	3
E239K	E74K	5.1E+07	5.1E+06	10%	114%	3
H257F	H92F	4.8E+07	6.6E+06	14%	108%	3
H257Y	H92Y	3.4E+07	9.1E+06	27%	75%	3
H257E	H92E	2.7E+07	1.5E+07	57%	60%	3
H257S	H92S	3.5E+07	1.3E+07	36%	78%	3
T412A	T242A	4.6E+07	2.8E+07	62%	103%	5
T412V	T242V	5.8E+07	3.2E+07	55%	130%	8
E410N/T412A	E240N/T242A	8.0E+07	1.7E+07	21%	178%	4
E410N/T412V	E240N/T242V	8.8E+07	2.7E+07	30%	197%	4
E410Q	E240Q	1.2E+08	7.6E+07	63%	269%	4
E410S	E240S	1.1 E+08	6.6E+07	60%	246%	12
E410A	E240A	1.1E+08	5.6E+07	50%	248%	10
E410D	E240D	6.0E+07	1.6E+07	27%	134%	4
N346D	N178D	1.9E+07	8.5E+06	44%	43%	4
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	1.3E+07	6.8E+06	53%	29%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	% de WT k_{cat}/K_M	n
N346Y	N178Y	9.8E+07	2.3E+07	24%	218%	8
Y345A	Y177A	1.5E+07	6.3E+06	43%	32%	4
Y345T	Y177T	5.0E+07	2.5E+07	50%	112%	4
T343R	T175R	1.7E+08	1.1E+08	66%	372%	9
T343E	T175E	4.0E+07	2.3E+07	58%	88%	4
T343Q	T175Q	7.1E+07	2.2E+07	30%	159%	3
F342I	F174I	5.4E+07	2.9E+07	54%	121%	3
T343R/Y345T	TI75R/Y177T	9.3E+07	1.8E+07	19%	208%	3
R318Y/R338E	R150Y/R170E	1.5E+08	5.3E+07	36%	331%	4
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	5.6E+07	1.2E+07	21%	126%	2
K228N/I251S	K63N/I86S	2.2E+07	5.7E+05	3%	50%	2
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.6E+08	6.1 E+07	39%	349%	3
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/RI70E /R233E/E240N	2.0E+08	9.3E+06	5%	453%	2
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.6E+08	2.3E+07	15%	346%	2
1251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.5E+08	4.2E+07	27%	344%	4
D104N/K106S/1251S/R318 Y/R33SE/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.2E+08	2.0E+07	16%	271%	8

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	% de WT k_{cat}/K_M	n
Y155F1251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.7E+08	9.2E+06	6%	374%	2
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	3.8E+08	6.1 E+07	16%	851%	7
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	1.3E+08	3.2E+07	24%	300%	3
F314N/K316S	F145N/K148S	8.8E+04	8.2E+04	94%	0.2%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.5E+08	4.7E+07	30%	341%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.8E+08	6.1E+07	33%	408%	6
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.0E+08	7.6E+06	7%	232%	2
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	8.8E+07	6.5E+06	7%	197%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	2.3E+08	6.6E+07	28%	516%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	3.0E+08	1.3E+08	42%	674%	7
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	1.8E+08	6.2E+07	34%	401%	4
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	3.3E+08	1.2E+08	37%	730%	8
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	3.8E+07	1.2E+07	32%	86%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	6.3E+07	3.3E+06	5%	142%	2
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	2.3E+07	1.1 E+07	48%	51%	5

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	% de WT k_{cat}/K_M	n
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[1 55]F/K63N/K82N/N84S	5.3E+07	5.5E+06	10%	118%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.2E+08	3.8E+07	33%	258%	3
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	1.9E+08	5.0E+07	26%	424%	4
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E244N/T242A	2.6E+08	7.4E+07	29%	577%	4
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	8.0E+07	3.4E+07	42%	178%	4
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	3.0E+08	8.3E+07	28%	661%	6
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	2.4E+08	1.4E+08	60%	536%	4
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	5.3E+07	6.6E+05	1%	117%	2
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/ R150Y/R170E/R233E/E240N	8.8E+07	7.9E+06	9%	196%	2
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E /R233E/E240N	7.0E+07	2.4E+07	35%	156%	2
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E /E240N	3.1E+07	9.1 E+06	30%	68%	2
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	6.2E+07	1.8E+07	30%	139%	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	2.9E+07	2.6E+06	9%	64%	2
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	1.9E+07	4.2E+06	22%	43%	2
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/ N84S/N95S	9.8E+06	3.0E+06	30%	22%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	8.2E+06	3.9E+06	47%	18%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	% de WT k_{cat}/K_M	n
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	9.7E+07	8.7E+06	9%	217%	2
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	2.2E+06	7.4E+05	34%	5%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/ E240N	5.4E+08	1.6E+08	29%	1217%	3
R338E/T343R	R170E/T175R	6.0E+08	1.7E+08	29%	1329%	4
† producido en células BHK-21; * 80% de forma glicosilada de E410N						

Tabla 15. Actividad catalítica de las variantes de FIXa (kcat / KM)

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
BeneFIX Benefix® Coagulación FIX (T148A)	BeneFIX Benefix® Coagulación FIX (T [148] A)	4.3E+07	2.3E+07	54%	92%	140
FIXa purificada por plasma	FIXa purificada por plasma	5.6E+07	2.6E+07	46%	122%	200
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	4.6E+07	2.5E+07	54%	100%	33
N157D	N[157]D	2.9E+07	8.1 E+06	28%	62%	2
Y155F	Y[155]F	4.1E+07	1.3E+05	0%	90%	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	3.9E+07	1.4E+06	4%	85%	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	3.6E+07	1.0E+06	3%	78%	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	3.7E+07	1.4E+07	38%	80%	9
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	3.8E+07	1.3E+07	34%	83%	9
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	2.8E+07	6.7E+06	24%	60%	7
D85N	D[85]N	7.0E+07	2.7E+07	39%	153%	17
T148A	T[148]A	4.0E+07	2.2E+07	54%	88%	44
T148A†	T[148]A†	2.3E+07	7.6E+06	33%	50%	7
K5A	K[5]A	5.5E+07	9.3E+06	17%	120%	4
D64N	D[64]N	1.0E+07	1.9E+06	19%	22%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
D64A	D[64]A	2.5E+06	1.1E+06	47%	5%	2
N167D	N[167]D	3.1E+07	1.1E+07	34%	67%	2
N167Q	N[167]Q	3.5E+07	1.9E+07	53%	76%	4
S61A	S[61]A	4.8E+07	2.5E+07	52%	105%	4
S53A	S[53]A	3.5E+07	1.7E+07	48%	76%	3
T159A	T[159]A	3.7E+07	1.2E+07	33%	80%	3
T169A	T[169]A	4.7E+07	2.0E+07	43%	103%	3
T172A	T[172]A	5.0E+07	2.6E+07	52%	109%	3
T179A	T[179]A	5.5E+07	1.3E+07	23%	119%	3
Y155H	Y[155]H	5.0E+07	1.4E+07	27%	109%	3
Y155Q	Y[155]Q	5.4E+07	2.0E+07	36%	117%	3
S158A	S[158]A	3.6E+07	1.1E+06	3%	79%	2
S158D	S[158]D	4.0E+07	9.3E+05	2%	86%	2
S158E	S[158]E	3.7E+07	3.5E+06	9%	80%	2
N157Q	N[157]Q	3.2E+07	2.8E+06	9%	70%	2
D203N/F205T	D39N/F41T	2.2E+07	1.2E+07	53%	49%	12
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	3.0E+07	6.4E+06	22%	64%	5

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
K228N	K63N	3.6E+07	1.7E+07	49%	77%	13
D85N/K228N	D[85]N/K63N	4.6E+07	1.5E+07	32%	101%	6
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	2.9E+07	1.0E+07	35%	63%	3
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	2.6E+07	7.6E+06	29%	57%	3
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	4.5E+07	2.4E+06	5%	98%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	5.9E+07	1.1E+07	19%	129%	2
I251 S	I86S	5.9E+07	1.2E+07	21%	128%	13
D85N/I251S	D[85]N/186S	5.6E+07	1.1E+07	20%	121%	5
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	3.3 E+07	6.4E+06	19%	73%	5
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	3.9E+07	2.6E+07	67%	84%	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	2.9E+07	1.1E+06	4%	64%	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	6.7E+07	5.9E+06	9%	145%	2
A262S	A95bS	2.4E+07	1.0E+07	42%	52%	8
K413N	K243N	2.8E+07	1.4E+07	51%	60%	7
E410N	E240N	1.3E+08	7.7E+07	60%	277%	27
E410N*	E240N*	3.0E+07	1.1E+07	36%	65%	10
E239N	E74N	2.0E+07	1.1E+07	58%	43%	9

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
T241N/H243S	T76N/H78S	1.9E+07	5.7E+05	3%	41%	2
K247N/N249S	K82N/N84S	5.4E+07	1.7E+07	32%	118%	11
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	5.1E+07	9.6E+06	19%	110%	4
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	4.0E+07	5.2E+06	13%	87%	6
D104N/K106S/K247N/N249S	D[I04]N/K[106]S/K82N/N84S	3.2E+07	3.3E+06	10%	69%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	3.2E+07	1.1E+07	36%	69%	3
L321N	L153N	1.6E+07	2.0E+06	13%	34%	2
F314N/H315S	F145N/H147S	4.4E+05	3.7E+04	8%	1%	2
K392N/K394S	K222N/K224S	0.0E+00	n.d.	n.d.	0%	0
S319N/L321S	S151N/L153S	2.8E+07	2.2E+07	78%	62%	3
N260S	N95S	1.8E+07	1.2E+07	66%	38%	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	1.3E+07	6.6E+06	51%	28%	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	1.9E+07	1.6E+07	83%	42%	2
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]SN[155]F/N95S	4.3E+06	2.0E+06	46%	9%	2
Y284N	Y117N	3.5E+07	1.5E+07	42%	76%	8
G317N	G149N	4.6E+04	n.d.	n.d.	0%	1
R318N/A320S	R150N/A152S	2.3E+05	2.1E+05	89%	1%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
R318A	R150A	4.5E+07	6.4E+06	14%	98%	2
R318E	R150E	1.7E+07	4.2E+06	25%	37%	3
R318Y	R150Y	7.0E+07	7.0E+06	10%	151%	3
R312Q	R143Q	1.1E+07	1.8E+06	17%	23%	3
R312A	R143A	4.6E+06	9.3E+05	20%	10%	2
R312Y	R143Y	1.2E+07	4.2E+06	36%	26%	2
R312L	R143L	2.4E+07	9.4E+06	39%	53%	2
V202M	V38M	6.6E+07	2.6E+07	39%	143%	2
V202Y	V38Y	2.5E+07	1.6E+06	6%	55%	2
D203M	D39M	4.5E+07	1.9E+07	42%	98%	5
D203Y	D39Y	3.0E+07	2.8E+06	9%	65%	4
A204M	A40M	1.8E+07	1.2E+07	67%	39%	5
A204Y	A40Y	4.6E+07	7.6E+06	16%	100%	2
K400A/R403A	K230A/R233A	5.3E+06	6.9E+05	13%	12%	2
K400E/R403E	K230E/R233E	4.3E+05	3.1E+04	7%	1%	3
R403A	R233A	1.4E+07	3.0E+06	22%	30%	7
R403E	R233E	5.5E+06	1.5E+06	28%	12%	6

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
K400A	K230A	2.0E+07	3.1E+06	16%	43%	2
K400E	K230E	9.5E+06	1.1E+06	12%	21%	2
K293E	K126E	8.1 E+06	5.4E+05	7%	17%	2
K293A	K126A	2.1 E+07	4.4E+06	21%	45%	2
R333A	R165A	1.6E+05	1.1E+04	7%	0%	2
R333E	R165E	1.3E+04	n.d.	n.d.	0%	1
R338A	R170A	1.6E+08	2.5E+07	15%	350%	2
R338E	R170E	1.8E+08	8.3E+07	45%	396%	10
R338A/R403A	R170A/R233A	5.3E+07	1.3E+07	24%	115%	6
R338E/R403E	R170E/R233E	6.2E+07	8.8E+06	14%	134%	2
K293A/R403A	K126A/R233A	5.7E+06	1.4E+06	25%	12%	2
K293E/R403E	K126E/R233E	1.3E+06	8.5E+04	6%	3%	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	2.5E+07	9.5E+06	39%	53%	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	1.7E+07	5.7E+05	3%	36%	2
R318A/R403A	R150A/R233A	1.5E+07	1.3E+06	9%	32%	2
R318E/R403E	R150E/R233E	1.2E+06	3.8E+05	33%	3%	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	7.5E+07	2.7E+07	35%	163%	21

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
R338E/E410N	R170E/E240N	4.4E+08	1.5E+08	33%	950%	12
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	1.9E+08	1.4E+08	72%	411%	17
Y155F/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/R233E/E240N	1.8E+08	6.0E+07	32%	401%	2
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	6.2E+07	6.3E+06	10%	134%	3
Y155F/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/R150Y/RI70E/R233E	8.7E+07	5.1E+07	58%	189%	2
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	1.4E+07	2.5E+06	18%	30%	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	4.2E+07	1.7E+07	40%	91%	6
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	1.0E+08	2.3E+07	22%	228%	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	6.2E+07	1.4E+07	22%	135%	3
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	2.0E+07	2.5E+06	12%	44%	4
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	1.9E+07	4.8E+06	25%	41%	2
K228N/E410N	K63N/E240N	8.5E+07	3.4E+07	40%	184%	10
K228N/R338E	K63N/R170E	2.1E+08	6.1E+07	29%	455%	2
K228N/R338A	K63N/R170A	2.1E+08	4.6E+07	22%	459%	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	4.7E+07	6.5E+06	14%	102%	5
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	4.8E+07	8.6E+06	18%	105%	2
R403E/E410N	R233E/E240N	2.1E+07	1.7E+06	8%	46%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	3.4E+08	1.2E+08	37%	727%	42
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	2.6E+08	5.9E+07	23%	564%	4
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	3.7E+08	1.3E+08	33%	810%	5
K228N/R318Y/E4]ON	K63N/R150Y/E240N	1.2E+08	2.6E+07	22%	264%	4
R318Y/R403EIE410N	R150Y/R233E/E240N	2.5E+07	4.7E+06	19%	54%	5
Y155F/R318Y/R403E/E410N	bY[155]F/R150Y/Rb233E/E240N	3.6E+07	2.9E+07	82%	78%	2
R318Y/R338E/R4O3E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	1.5E+08	8.2E+07	56%	320%	26
A103N/N105S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.5E+08	7.3E+07	50%	318%	5
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.7E+08	7.9E+07	47%	366%	3
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.9E+08	5.0E+07	27%	406%	4
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.3E+08	1.8E+06	1%	274%	2
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.8E+08	9.1E+06	5%	382%	2
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	3.9E+07	2.0E+07	52%	85%	6
R333S	R165S	1.1E+05	5.5E+04	51%	0%	3
R338L	R170L	2.0E+08	2.3E+07	11%	431%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
K316N	K148N	6.2E+06	4.2E+06	69%	13%	3
K316A	K148A	6.1E+06	8.2E+05	13%	13%	3
K316E	K148E	7.1E+05	1.4E+05	19%	2%	3
K316S	K148S	3.9E+06	6.2E+05	16%	9%	3
K316M	K148M	3.1E+07	1.4E+07	46%	68%	3
E239S	E74S	3.4E+07	1.8E+07	52%	73%	3
E239A	E74A	4.9E+07	6.2E+06	13%	107%	3
E239R	E74R	5.6E+07	1.1E+07	19%	122%	3
E239K	E74K	5.1E+07	5.1E+06	10%	111%	3
H257F	H92F	4.8E+07	6.6E+06	14%	105%	3
H257Y	H92Y	3.4E+07	9.1 E+06	27%	73%	3
H257E	H92E	2.7E+07	1.5E+07	57%	58%	3
H257S	H92S	3.5E+07	1.3E+07	36%	76%	3
T412A	T242A	4.6E+07	2.8E+07	62%	100%	5
T412V	T242V	5.8E+07	3.2E+07	55%	126%	8
E410N/T412A	E240N/T242A	8.0E+07	1.7E+07	21%	173%	4
E410N/T412V	E240N/T242V	8.8E+07	2.7E+07	30%	192%	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
E410Q	E240Q	1.2E+08	7.6E+07	63%	261%	4
E410S	E240S	1.1E+08	6.6E+07	60%	239%	12
E410A	E240A	1.1E+08	5.6E+07	50%	241%	10
E410D	E240D	6.0E+07	1.6E+07	27%	130%	4
N346D	N178D	1.9E+07	8.5E+06	44%	42%	4
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	1.3E+07	6.8E+06	53%	28%	2
N346Y	N178Y	9.8E+07	2.3E+07	24%	212%	8
Y345A	Y177A	1.5E+07	6.3E+06	43 %	32%	4
Y345T	Y177T	5.0E+07	2.5E+07	50%	108%	4
T343R	T175R	1.4E+08	1.0E+08	70%	313%	12
T343E	T175E	4.0E+07	2.3E+07	58%	86%	4
T343Q	T175Q	7.1 E+07	2.2E+07	30%	154%	3
F342I	F174I	5.4E+07	2.9E+07	54%	118%	3
T343R7Y345T	T175R/Y177T	9.3E+07	1.8E+07	19%	202%	3
R318Y/R338E	R150Y/R170E	1.5E+08	5.3E+07	36%	322%	4
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	5.6E+07	1.2E+07	21%	122%	2
K228N/I251S	K63N/I86S	2.2E+07	5.7E+05	3%	48%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.6E+08	6.1E+07	39%	339%	3
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.6E+08	4.1E+07	25%	356%	5
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.6E+08	2.3E+07	15%	336%	2
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.5E+08	4.2E+07	27%	334%	4
D104N/K106S/I25S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.2E+08	2.0E+07	16%	263%	8
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.7E+08	9.2E+06	6%	363%	2
I251S/R318Y/R338E/ E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	3.9E+08	7.4E+07	19%	849%	10
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	1.3E+08	3.2E+07	24%	291%	3
F314N/K316S	F145N/K148S	8.8E+04	8.2E+04	94%	0%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.5E+08	4.7E+07	30%	331%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.9E+08	5.7E+07	30%	405%	10
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.5E+08	4.2E+07	28%	324%	6
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	8.8E+07	6.5E+06	7%	192%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.3E+08	7.3E+07	54%	292%	6

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	2.3E+08	6.6E+07	28%	501%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	3.3E+08	1.3E+08	39%	717%	9
R318Y/R338E/R403E/ E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	2.1 E+08	6.1E+07	29%	458%	7
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	3.3E+08	1.2E+08	37%	708%	8
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	3.8E+07	1.2E+07	32%	83%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	6.3E+07	3.3E+06	5%	137%	2
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	2.3E+07	1.1E+07	48%	49%	5
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	5.3E+07	5.5E+06	10%	115%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.6E+08	8.4E+07	51%	352%	17
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.1E+08	4.4E+07	40%	239%	7
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.2E+08	5.3E+07	44%	263%	5
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	1.6E+08	6.3E+07	40%	342%	6
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	2.5E+08	9.2E+07	37%	538%	6
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	8.0E+07	3.4E+07	42%	173%	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	3.0E+08	8.3E+07	28%	642%	6
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	2.6E+08	1.2E+08	46%	571%	11
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.3E+07	6.6E+05	1%	114%	2
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	8.8E+07	7.9E+06	9%	190%	2
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	7.0E+07	2.4E+07	35%	152%	2
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	3.1E+07	9.1 E+06	30%	66%	2
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	6.2E+07	1.8E+07	30%	135%	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	2.9E+07	2.6E+06	9%	62%	2
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	1.9E+07	4.2E+06	22%	42%	2
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	9.8E+06	3.0E+06	30%	21%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	8.2E+06	3.9E+06	47%	18%	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.7E+07	2.6E+07	38%	145%	6
Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.7E+07	3.6E+07	64%	124%	5
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	2.2E+06	7.4E+05	34%	5%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	4.2E+08	1.4E+08	33%	907%	13
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	3.0E+08	8.3E+07	28%	640%	4
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2.2E+08	1.2E+08	52%	487%	5
R338E/T343R	R170E/T175R	5.2E+08	1.6E+08	31%	1120%	7
T343R/N346Y	T175R/N178Y	9.6E+07	4.4E+07	46%	208%	11
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E[N178Y/R233E/E240N	1.2E+08	2.1E+07	16%	270%	3
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	3.1E+08	1.1E+08	37%	663%	5
T343R/N346D	T175R/N178D	1.6E+07	2.6E+06	16%	36%	2
R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/E240N	8.2E+07	3.2E+06	4%	177%	2
R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	8.3E+07	3.6E+07	44%	180%	6
R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/N178D/R233E/E240N	2.3E+07	7.6E+06	33%	49%	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	9.5E+07	6.6E+07	69%	206%	5
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	2.3E+08	1.6E+08	71%	496%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	1.0E+07	4.5E+06	45%	22%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	2.7E+07	1.2E+07	44%	58%	10
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	1.1E+08	2.4E+07	23%	229%	3
K247N/N249S/R33SE/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	1.9E+08	2.9E+07	15%	422%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	1.6E+08	7.4E+07	45%	357%	4
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E	2.6E+08	1.7E+08	65%	563%	4
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	3.4E+08	1.6E+08	48%	728%	16
Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/E240N	3.7E+08	1.2E+08	32%	794%	4
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	5.8E+07	1.8E+07	31%	125%	3
Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/175R/R233E/E240N	2.6E+08	5.0E+07	19%	571%	2
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	3.0E+08	8.2E+07	27%	650%	2
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	2.4E+08	1.0E+08	42%	524%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E 410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	4.0E+08	1.5E+08	37%	864%	11
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	3.8E+08	1.5E+08	40%	824%	5
K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2.1E+08	7.2E+07	34%	463%	7
Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.4E+08	5.0E+07	37%	296%	5

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2.9E+08	1.1E+08	38%	638%	7
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/Rl70E/T175R/R233E/E240N	1.5E+08	6.0E+07	39%	335%	5
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	4.1 E+08	1.4E+08	34%	880%	12
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	3.0E+08	1.1E+08	37%	646%	5
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	2.0E+08	7.7E+07	39%	429%	5
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	3.1E+08	9.6E+07	31%	663%	2
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	2.9E+08	1.0E+08	35%	629%	6
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	9.4E+07	3.1E+07	33%	203%	6
Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	3.0E+08	1.6E+07	5%	651%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	4.4E+08	1.7E+08	39%	962%	14
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	8.5E+07	2.7E+07	31%	184%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	2.9E+08	5.0E+06	2%	630%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	4.1E+08	2.2E+08	55%	886%	4
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	3.7E+08	1.1 E+07	3%	805%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	4.3E+08	1.2E+07	3%	930%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	2.9E+08	4.1E+07	14%	632%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R	2.5E+08	9.4E+07	37%	549%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E	1.6E+07	5.4E+06	35%	34%	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/E240N	7.2E+07	2.5E+07	35%	155%	3
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	1.4E+08	5.7E+07	41%	299%	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	7.3E+08	2.6E+08	36%	1579%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	5.0E+08	2.8E+08	57%	1091%	4
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	3.2E+08	1.6E+08	50%	687%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	1.6E+08	6.2E+07	38%	350%	2
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K82NN84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	1.3E+08	3.9E+07	30%	279%	7
Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/ E240N	4.7E+08	3.1E+08	66%	1009%	8
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	1.3E+08	5.1E+07	40%	276%	2
K247N/N2498/R318Y/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	3.9E+07	2.2E+07	57%	84%	9

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R7E240N	3.1 E+08	2.1E+08	67%	668%	4
K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	2.0E+08	1.6E+08	77%	439%	4
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	5.9E+08	5.8E+07	10%	1269%	2
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	5.6E+08	8.8E+07	16%	1215%	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	1.8E+08	1.1E+07	6%	391%	2
K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	3.1E+08	1.0E+08	33%	676%	5
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	2.9E+08	8.8E+07	30%	635%	2
K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	1.3E+08	1.7E+07	13%	285%	2
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	3.6E+08	1.5E+08	41%	771%	7
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	1.5E+08	3.3E+07	22%	324%	2
Y155F/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E	7.1E+07	1.4E+07	20%	154%	2
Y155F/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/T175R/R233E/E240N	1.5E+08	2.4E+07	17%	321%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	3.6E+08	1.6E+08	45%	772%	7
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	3.9E+08	1.6E+08	43%	840%	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% de WT k_{cat}/K_M	n
Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240N	2.8E+08	1.1E+08	38%	599%	5
Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R233E/E240N	2.4E+07	1.4E+07	59%	53%	7
Y155F/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R170F/T175R/E240N	3.5E+08	2.2E+08	62%	761%	6
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	9.3E+07	2.8E+07	30%	201%	2
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	1.5E+08	6.6E+07	44%	326%	4
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	6.2E+07	1.1E+07	17%	135%	2
K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2.7E+08	8.8E+07	32%	593%	3
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	2.9E+08	1.3E+08	46%	636%	3
K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	1.3E+08	4.5E+07	35%	278%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	7.1 E+07	3.3E+07	46%	153%	3

† producido en células BHK-21; * 80% de forma glucosilada de E410N

Tabla 16. Actividad catalítica de las variantes de FIXa (kcat)

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
BeneFIX Benefix® Coagulación FIX (T148A)	BeneFIX Benefix® Coagulación FIX (T [148] A)	2.8	1.1	39%	125
FIXa purificada por plasma	FIXa purificada por plasma	3.6	1.2	34%	120
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	3.1	1.4	46%	31
N157D	N[157]D	3.3	0.5	16%	2
Y155F	Y[155]F	3.7	0.4	11%	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	3.2	0.0	0%	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	2.9	0.1	4%	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	3.1	1.0	31%	9
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	3.1	1.1	34%	9
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	2.5	0.5	21%	7
D85N	D[85]N	4.2	0.8	19%	15
T148A	T[148]A	2.2	0.9	42%	30
T148A†	T[148]A†	1.6	0.2	14%	7
K5A	K[5]A	3.1	0.2	8%	2
D64N	D[64]N	1.2	0.4	31%	2
D64A	D[64]A	0.3	0.2	70%	2
N167D	N[167]D	2.9	0.8	27%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
N167Q	N[167]Q	2.3	0.7	32%	4
S61A	S[61]A	3.6	1.5	41%	4
S53A	S[53]A	3.7	1.7	44%	3
T159A	T[159]A	3.7	1.2	34%	3
T169A	T[169]A	4.6	1.6	36%	3
T172A	T[172]A	4.4	1.5	34%	3
T179A	T[179]A	5.1	0.6	12%	3
Y155H	Y[155]H	4.6	0.9	18%	3
Y155Q	Y[155]Q	4.4	1.0	24%	3
S158A	S[158]A	3.9	0.1	3%	2
S158D	S[158]D	3.5	0.3	8%	2
S158E	S[158]E	3.5	0.2	5%	2
N157Q	N[157]Q	3.5	0.1	4%	2
D203N/F205T	D39N/F41T	1.6	0.6	40%	12
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	1.2	0.5	40%	5
K228N	K63N	2.7	1.2	43%	13
D85N/K228N	D[85]N/K63N	2.7	0.8	29%	6

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	2.1	0.5	22%	3
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	2.4	0.1	6%	3
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	3.3	0.3	10%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	4.6	1.2	27%	2
I251S	I86S	3.8	1.1	30%	13
D85N/I251S	D[85]N/I86S	2.8	0.6	22%	5
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I8 6S	1.5	0.3	19%	5
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	2.9	1.0	36%	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	2.9	0.5	18%	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	3.7	0.8	22%	2
A262S	A95bS	2.3	0.7	32%	8
K413N	K243N	2.6	0.5	19%	5
E410N	E240N	5.0	2.2	45%	21
E410N*	E240N*	2.2	0.5	25%	11
E239N	E74N	1.4	0.5	36%	9
T241N/H243S	T76N/H78S	2.0	0.0	0%	2
K247N/N249S	K82N/N84S	3.9	1.0	26%	11

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	3.3	0.7	21%	4
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	3.4	0.5	15%	6
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	3.3	1.1	32%	2
D104N/K106S/Y155F/K247 N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	2.8	1.1	40%	3
L321N	L153N	1.9	0.1	4%	2
F314N/H315S	F145N/H147S	Sin Actividad	n.d.	n.d.	4
S319N/L321S	S151N/L153S	1.4	0.9	61%	3
N260S	N95S	1.3	0.5	42%	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	1.2	0.7	58%	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	1.9	0.6	32%	2
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	0.4	0.1	28%	2
Y284N	Y117N	2.0	0.9	45%	8
G317N	G149N	Sin Actividad	n.d.	n.d.	5
R318N/A320S	R150N/A152S	Sin Actividad	n.d.	n.d.	8
R318A	R150A	2.4	0.8	32%	3
R318E	R150E	0.6	0.2	35%	3
R318Y	R150Y	2.9	0.7	26%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
R312Q	R143Q	0.3	0.1	26%	3
R312A	R143A	0.3	0.0	8%	2
R312Y	R143Y	0.4	0.3	73%	2
R312L	R143L	0.7	0.3	41%	2
V202M	V38M	2.6	1.0	37%	2
V202Y	V38Y	1.8	0.2	10%	2
D203M	D39M	1.8	0.8	42%	5
D203Y	D39Y	1.7	0.5	27%	4
A204M	A40M	0.6	0.5	84%	5
A204Y	A40Y	1.9	0.8	42%	2
K400A/R403A	K230A/R233A	0.3	0.0	5%	2
K400E/R403E	K230E/R233E	Sin Actividad	n.d.	n.d.	4
R403A	R233A	0.6	0.2	24%	7
R403E	R233E	0.4	0.1	25%	6
K400A	K230A	1.4	0.2	14%	2
K400E	K230E	0.6	0.0	4%	2
K293E	K126E	0.5	0.1	15%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
K293A	K126A	1.4	0.4	28%	2
R333A	R165A	Sin Actividad	n.d.	n.d.	2
R333E	R165E	Sin Actividad	n.d.	n.d.	2
R338A	R170A	5.4	0.3	5%	2
R338E	R170E	4.7	1.0	21%	10
R338A/R403A	R170A/R233A	3.8	0.9	24%	6
R338E/R403E	R170E/R233E	3.3	1.2	37%	2
K293A/R403A	K126A/R233A	0.4	0.0	9%	2
K293E/R403E	K126E/R233E	0.1	0.0	37%	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	1.6	0.7	41%	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	0.8	0.2	27%	2
R318A/R403A	R150A/R233A	0.7	0.1	12%	2
R318E/R403E	R150E/R233E	0.1	0.0	35%	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	3.5	0.9	27%	21
R338E/E410N	R170E/E240N	5.2	0.8	16%	8
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	3.3	1.3	39%	7
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	3.5	0.4	11%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	0.6	0.2	27%	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	1.7	0.3	16%	6
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	2.5	0.0	2%	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	2.3	0.5	23%	3
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	0.9	0.1	13%	4
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	0.9	0.0	5%	2
K228N/E410N	K63N/E240N	3.5	0.9	27%	10
K228N/R338E	K63N/R170E	4.8	0.8	17%	2
K228N/R338A	K63N/R170A	6.5	0.5	7%	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	2.9	0.6	19%	5
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	2.8	0.3	9%	2
R403E/E410N	R233E/E240N	2.0	0.2	9%	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	4.6	1.3	29%	26
D104N/K106S/R318Y/R33 8E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	4.8	0.6	12%	4
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	5.6	1.4	25%	5
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	5.0	0.5	10%	4
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	2.3	0.3	15%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	5.0	3.1	63%	14
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.4	0.9	16%	5
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.7	1.1	20%	3
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.3	0.7	12%	4
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.4	0.5	7%	2
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	8.5	0.8	10%	2
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	1.6	0.6	36%	6
R333S	R165S	0.05	0.01	22%	3
R338L	R170L	9.5	1.9	21%	3
K316N	K148N	0.3	0.1	39%	3
K316A	K148A	0.3	0.1	21%	3
K316E	K148E	0.1	0.0	9%	3
K316S	K148S	0.2	0.0	10%	3
K316M	K148M	0.7	0.1	15%	3
E239S	E74S	0.7	0.1	19%	3
E239A	E74A	2.8	1.2	43%	3
E239R	E74R	3.4	1.4	42%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
E239K	E74K	3.0	1.1	36%	3
H257F	H92F	3.0	1.4	46%	3
H257Y	H92Y	2.0	1.1	55%	3
H257E	H92E	1.3	0.4	28%	3
H257S	H92S	1.8	0.3	18%	3
T412A	T242A	2.6	0.3	13%	5
T412V	T242V	2.6	0.6	25%	8
E410N/T412A	E240N/T242A	2.9	0.4	13%	4
E410N/T412V	E240N/T242V	2.9	0.5	16%	4
E410Q	E240Q	6.0	2.8	46%	4
E410S	E240S	4.9	1.6	32%	12
E410A	E240A	4.8	1.6	32%	10
E410D	E240D	4.0	0.7	19%	4
N346D	N178D	0.8	0.2	29%	4
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	1.3	0.5	41%	2
N346Y	N178Y	2.6	0.2	9%	8
Y345A	Y177A	0.7	0.6	83%	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
Y345T	Y177T	1.3	0.3	27%	4
T343R	T175R	4.3	1.2	27%	9
T343E	T175E	1.0	0.7	72%	4
T343Q	T175Q	2.5	0.3	11%	3
F342I	F174I	1.3	0.2	16%	3
T343R/Y345T	T175R/Y177T	2.4	0.3	14%	3
R318Y/R338E	R150Y/R170E	3.4	0.5	14%	4
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	1.7	0.1	5%	2
K228N/I251S	K63N/I86S	2.7	1.1	41%	2
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.1	0.7	14%	3
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	9.7	1.6	16%	2
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.0	0.6	10%	2
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	4.8	0.6	12%	4
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.5	0.9	17%	8
Y155F/1251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	7.2	0.8	11%	2
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	6.2	1.2	20%	7
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	3.1	0.6	19%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
F314N/K316S	F145N/K148S	0.0	0.0	7%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.8	1.1	19%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.5	1.1	17%	6
A103N/N105S/K247N/N24 9S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	4.1	0.8	18%	2
D104N/K106S/K247N/N24 9S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.2	0.3	6%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	3.8	1.6	41%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	4.3	1.4	33%	7
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	5.8	0.6	10%	4
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	5.1	1.7	33%	8
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	3.5	0.1	4%	2
D104N/K106S/Y155F/K228 N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	4.7	1.4	30%	2
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	1.7	0.9	54%	5
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	4.3	1.9	44%	2
K228N/K247N/N249S/R31 8Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.1	0.7	12%	3
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	7.9	2.1	26%	4
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	8.4	1.5	18%	4
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	5.1	1.1	21%	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±S.D. (s^{-1})	%CV	n
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	7.0	2.8	39%	6
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	6.3	2.3	37%	4
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.8	1.1	29%	2
D104N/K106SN260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.4	0.5	9%	2
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.8	1.7	30%	2
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	2.5	1.3	54%	2
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	6.4	2.8	44%	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	3.3	0.3	9%	2
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	1.8	0.3	16%	2
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	0.6	0.0	7%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	0.5	0.0	2%	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.0	0.5	9%	2
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	0.3	0.1	29%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	11.8	2.4	20%	3
R338E/T343R	R170E/T175R	7.7	1.3	17%	4
t producido en células BHK-21; * 80% de forma glucosilada de E410N					

Tabla 17. Actividad catalítica de las variantes de FIXa (kcat)

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
BeneFIX Benefix® Coagulación FIX (T148A)	BeneFIX Benefix® Coagulación FIX (T [148] A)	2.9	1.1	39%	140
FIXa purificada por plasma	FIXa purificada por plasma	3.7	1.3	36%	200
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	3.1	1.4	46%	33
N157D	N[157]D	3.3	0.5	16%	2
Y155F	Y[155]F	3.7	0.4	11%	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	3.2	0.0	0%	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	2.9	0.1	4%	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	3.1	1.0	31%	9
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	3.1	1.1	34%	9
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	2.5	0.5	21%	7
D85N	D[85]N	4.1	0.8	20%	17
T148A	T[148]A	2.5	1.0	39%	44
T148A†	T[148]A†	1.6	0.2	14%	7
K5A	K[5]A	3.5	0.8	23%	4
D64N	D[64]N	1.2	0.4	31%	2
D64A	D[64]A	0.3	0.2	70%	2
N167D	N[167]D	2.9	0.8	27%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
N167Q	N[167]Q	2.3	0.7	32%	4
S61A	S[61]A	3.6	1.5	41%	4
S53A	S[53]A	3.7	1.7	44%	3
T159A	T[159]A	3.7	1.2	34%	3
T169A	T[169]A	4.6	1.6	36%	3
T172A	T[172]A	4.4	1.5	34%	3
T179A	T[179]A	5.1	0.6	12%	3
Y155H	Y[155]H	4.6	0.9	18%	3
Y155Q	Y[155]Q	4.4	1.0	24%	3
S158A	S[158]A	3.9	0.1	3%	2
S158D	S[158]D	3.5	0.3	8%	2
S158E	S[158]E	3.5	0.2	5%	2
N157Q	N[157]Q	3.5	0.1	4%	2
D203N/F205T	D39N/F41T	1.6	0.6	40%	12
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	1.2	0.5	40%	5
K228N	K63N	2.7	1.2	43%	13
D85N/K228N	D[85]N/K63N	2.7	0.8	29%	6

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
A103N/N105S/K228N	Af[103]N/N[105]S/K63N	2.1	0.5	22%	3
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	2.4	0.1	6%	3
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	3.3	0.3	10%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	4.6	1.2	27%	2
I251S	I86S	3.8	1.1	30%	13
D85N/I251S	D[85]N/I86S	2.8	0.6	22%	5
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	1.5	0.3	19%	5
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	2.9	1.0	36%	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	2.9	0.5	18%	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	3.7	0.8	22%	2
A262S	A95bS	2.3	0.7	32%	8
K413N	K243N	2.5	0.5	19%	7
E410N	E240N	4.9	2.0	41%	27
E410N*	E240N*	2.3	0.5	22%	10
E239N	E74N	1.4	0.5	36%	9
T241N/H243S	T76N/H78S	2.0	0.0	0%	2
K247N/N249S	K82N/N84S	3.9	1.0	26%	11

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	3.3	0.7	21%	4
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	3.4	0.5	15%	6
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/NS4S	3.3	1.1	32%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	2.8	1.1	40%	3
L321N	L153N	1.9	0.1	4%	2
F314N/H315S	F145N/H147S	0.0	0.0	7%	2
K392N/K394S	K222N/K224S	0.0	n.d.	n.d.	0
S319N/L321S	S151N/L153S	1.4	0.9	61%	3
N260S	N95S	1.3	0.5	42%	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	1.2	0.7	58%	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	1.9	0.6	32%	2
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	0.4	0.1	28%	2
Y284N	Y117N	2.0	0.9	45%	8
G317N	G149N	0.0	n.d.	n.d.	1
R318N/A320S	R150N/AI52S	0.0	0.0	95%	3
R318A	R150A	2.7	0.9	32%	2
R318E	R150E	0.6	0.2	35%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
R318Y	R150Y	2.9	0.7	26%	3
R312Q	R143Q	0.3	0.1	26%	3
R312A	R143A	0.3	0.0	8%	2
R312Y	R143Y	0.4	0.3	73%	2
R312L	R143L	0.7	0.3	41%	2
V202M	V38M	2.6	1.0	37%	2
V202Y	V38Y	1.8	0.2	10%	2
D203M	D39M	1.8	0.8	42%	5
D203Y	D39Y	1.7	0.5	27%	4
A204M	A40M	0.6	0.5	84%	5
A204Y	A40Y	1.9	0.8.	42%	2
K400A/R403A	K230A/R233A	0.3	0.0	5%	2
K400E/R403E	K230E/R233E	0.1	0.0	50%	3
R403A	R233A	0.6	0.2	24%	7
R403E	R233E	0.4	0.1	25%	6
K400A	K230A	1.4	0.2	14%	2
K400E	K230E	0.6	0.0	4%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
K293E	K126E	0.5	0.1	15%	2
K293A	K126A	1.4	0.4	28%	2
R333A	R165A	0.1	0.0	35%	2
R333E	R165E	0.0	n.d.	n.d.	1
R338A	R170A	5.4	0.3	5%	2
R338E	R170E	4.7	1.0	21%	10
R338A/R403A	R170A/R233A	3.8	0.9	24%	6
R338E/R403E	R170E/R233E	3.3	1.2	37%	2
K293A/R403A	K126A/R233A	0.4	0.0	9%	2
K293E/R403E	K126E/R233E	0.1	0.0	37%	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	1.6	0.7	41%	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	0.8	0.2	27%	2
R318A/R403A	R150A/R233A	0.7	0.1	12%	2
R318E/R403E	R150E/R233E	0.1	0.0	35%	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	3.5	0.9	27%	21
R338E/E410N	R170E/E240N	5.2	1.1	22%	12
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	5.8	3.0	52%	17

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
Y155F/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/R233E/E240N	5.9	0.4	7%	2
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	3.6	0.4	10%	3
Y155F/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E	5.1	1.0	19%	2
D203 N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	0.6	0.2	27%	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	1.7	0.3	16%	6
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	2.5	0.0	2%	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	2.3	0.5	23%	3
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	0.9	0.1	13%	4
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	0.9	0.0	5%	2
K228N/E410N	K63N/E240N	3.5	0.9	27%	10
K228N/R338E	K63N/R170E	4.8	0.8	17%	2
K228N/R338A	K63N/R170A	6.5	0.5	7%	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	2.9	0.6	19%	5
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	2.8	0.3	9%	2
R403E/E410N	R233E/E240N	2.0	0.2	9%	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	4.4	1.2	27%	42
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	4.8	0.6	12%	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	5.6	1.4	25%	5
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	5.0	0.5	10%	4
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	2.3	0.3	11%	5
Y155F/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R233E/E240N	2.9	0.6	20%	2
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	5.8	2.8	48%	26
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.4	0.9	16%	5
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.7	1.1	20%	3
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.3	0.7	12%	4
103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.4	0.5	7%	2
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	8.5	0.8	10%	2
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	1.6	0.6	36%	6
R333S	R165S	0.1	0.0	22%	3
R338L	R170L	9.5	1.9	21%	3
K316N	K148N	0.3	0.1	39%	3
K316A	K148A	0.3	0.1	21%	3
K316E	K148E	0.1	0.0	9%	3
K316S	K148S	0.2	0.0	10%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
K316M	K148M	0.7	0.1	15%	3
E239S	E74S	0.7	0.1	19%	3
E239A	E74A	2.8	1.2	43%	3
E239R	E74R	3.4	1.4	42%	3
E239K	E74K	3.0	1.1	36%	3
H257F	H92F	3.0	1.4	46%	3
H257Y	H92Y	2.0	1.1	55%	3
H257E	H92E	1.3	0.4	28%	3
H257S	H92S	1.8	0.3	18%	3
T412A	T242A	2.6	0.3	13%	5
T412V	T242V	2.6	0.6	25%	8
E410N/T412A	E240N/T242A	2.9	0.4	13%	4
E410N/T412V	E240N/T242V	2.9	0.5	16%	4
E410Q	E240Q	6.0	2.8	46%	4
E410S	E240S	4.9	1.6	32%	12
E410A	E240A	4.8	1.6	32%	10
E410D	E240D	4.0	0.7	19%	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
N346D	N178D	0.8	0.2	29%	4
Y155F/N346D	Y[155]F1N178D	1.3	0.5	41%	2
N346Y	N178Y	2.6	0.2	9%	8
Y345A	Y177A	0.7	0.6	83%	4
Y345T	Y177T	1.3	0.3	27%	4
T343R	T175R	4.1	1.1	27%	12
T343E	T175E	1.0	0.7	72%	4
T343Q	T175Q	2.5	0.3	11%	3
F342I	F174I	1.3	0.2	16%	3
T343R/Y345T	T175R/Y177T	2.4	0.3	14%	3
R318Y/R338E	R150Y/R170E	3.4	0.5	14%	4
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	1.7	0.1	5%	2
K228N/I251S	K63N/I86S	2.7	1.1	41%	2
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.1	0.7	14%	3
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.7	3.0	45%	5
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.0	0.6	10%	2
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	4.8	0.6	12%	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
D104N/K106S/1251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.5	0.9	17%	8
Y155F/1251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	7.2	0.8	11%	2
1251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	6.4	2.0	31%	10
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/186S/R150Y/R170E/E240N	3.1	0.6	19%	3
F314N/K316S	F145N/K148S	0.0	0.0	7%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.8	1.1	19%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.2	1.0	16%	10
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/P338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.9	0.4	11%	6
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82NM84S/R150Y/R170E/R233E1E240N	5.2	0.3	6%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.9	4.7	67%	6
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	3.8	1.6	41%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170F/E240N	4.5	1.3	28%	9
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	7.4	2.3	31%	7
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	5.1	1.7	33%	8
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	3.5	0.1	4%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N /N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	4.7	1.4	30%	2
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	1.7	0.9	54%	5
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	4.3	1.9	44%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	7.1	2.2	31%	17
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.1	3.7	61%	7
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.1	1.8	34%	5
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	7.0	2.1	30%	6
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	7.8	1.6	20%	6
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	5.1	1.1	21%	4
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	7.0	2.8	39%	6
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	5.2	1.7	33%	II
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.8	1.1	29%	2
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.4	0.5	9%	2
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.8	1.7	30%	2
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	2.5	1.3	54%	2
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	6.4	2.8	44%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	3.3	0.3	9%	2
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	1.8	0.3	16%	2
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	0.6	0.0	7%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	0.5	0.0	2%	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.4	2.1	62%	6
Y155F/K247N/N249S/H260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.6	1.2	33%	5
Y155F/N260S/N346D	Y[551]F/N95S/N178D	0.3	0.1	29%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	9.7	2.6	27%	13
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	7.8	1.9	24%	4
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	5.7	2.3	41%	5
R338E/T343R	R170E/T175R	7.1	1.4	20%	7
T343R/N346Y	T175R/N178Y	2.3	0.5	21%	11
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/E240N	3.4	0.3	9%	3
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	4.6	1.2	26%	5
T343R/N346D	T175R/N178D	1.9	0.4	21%	2
R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/E240N	5.4	2.0	36%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	1.4	0.5	36%	6
R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/E410N	R1510Y/R170E/Y177A/N178D/R233E/E240N	1.2	0.3	26%	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	5.7	3.2	55%	5
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	10.5	3.6	34%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	1.2	0.5	40%	3
K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	2.9	1.6	55%	10
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	5.0	0.6	13%	3
K247N/N249S/R33SE/R403E/E410N	K92N/N84S/R170E/R233E/E240N	4.8	0.8	17%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	6.7	1.6	24%	4
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E	8.2	4.1	50%	4
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	4.9	1.2	24%	16
Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/E240N	9.2	3.1	33%	4
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	5.3	0.9	17%	3
Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E/E240N	8.8	0.3	4%	2
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	9.8	1.4	15%	2
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	5.7	1.1	20%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	9.7	3.4	35%	11

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	10.6	3.6	34%	5
K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	7.5	3.3	44%	7
Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/I86S/R150Y/R170E/R2 33E/E240N	5.3	1.9	36%	5
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	8.9	3.6	40%	7
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	5.8	1.6	28%	5
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233 E/E240N	9.9	3.2	32%	12
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	9.4	2.3	25%	5
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	5.2	0.9	18%	5
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	6.9	0.3	4%	2
Y155F/R338E/T343R7R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	6.8	2.4	34%	6
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	6.4	3.8	59%	6
Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	5.9	0.7	12%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	7.6	1.7	22%	14
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	4.7	0.2	5%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	10.6	0.8	8%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	9.2	3.3	36%	4
Y 155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233 E/E240N	9.8	0.7	8%	2
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	10.8	1.6	15%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	7.5	1.5	20%	2
Y55F/K247N/N249S/R318Y/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R	10.3	3.3	32%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E	1.7	0.7	42%	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/E240N	3.4	0.9	26%	3
Y 155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y(155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	5.3	0.6	11%	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	10.6	1.1	10%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	7.7	2.3	30%	4
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	8.8	4.4	50%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R1R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	9.0	0.4	5%	2
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	9.5	1.6	17%	7
Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/E240N	7.3	3.5	48%	8
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	7.5	2.1	28%	2
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	3.7	1.6	44%	9

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
Y155SF/K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	8.1	4.1	51%	4
K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	K82N/NS4S/R/50Y/T175R/E240N	6.1	2.6	42%	4
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	14.6	0.2	1%	2
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	14.6	0.4	3%	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	4.8	1.0	20%	2
K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	7.9	1.4	18%	5
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	15.0	3.0	20%	2
K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	8.0	2.8	36%	2
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	7.9	3.0	38%	7
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	4.5	1.2	27%	2
Y155F/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E	5.0	1.1	22%	2
Y155F/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/T175R/R233E/E240N	6.6	1.4	21%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	8.5	3.3	39%	7
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	8.0	1.7	22%	4
Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240N	7.9	1.6	20%	5
Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R233E/F240N	2.7	1.4	52%	7
Y155F/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/E240N	6.0	2.2	37%	6

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	k_{cat} (s^{-1})	±D.E. (s^{-1})	%CV	n
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	3.1	0.5	16%	2
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	5.0	1.3	25%	4
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	3.2	0.4	13%	2
K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	10.5	0.7	6%	3
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	10.9	1.4	13%	3
K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R70E/T175R/E240N	4.7	0.4	8%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	8.1	2.1	26%	3
t producido en células BHK-21; * 80% de forma glucosilada de E410N					

Tabla 18. Actividad catalítica de las variantes de FIXa (KM)

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
BeneFIX Benefix® Coagulación FIX (T148A)	BeneFIX Benefix® Coagulación FIX (T [148] A)	76.9	27.5	36%	125
FIXa purificada por plasma	FIXa purificada por plasma	74.5	25.5	34%	120
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	74.7	23.1	31%	31
N157D	N[157]D	121.8	53.0	44%	2
Y155F	Y[155]F	90.3	10.3	11%	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	80.4	2.5	3%	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	81.5	5.2	6%	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	88.0	22.5	26%	9
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	83.2	18.2	22%	9
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	91.9	20.2	22%	7
D85N	D[85]N	64.5	23.1	36%	15
T148A	T[148]A	64.5	25.1	39%	30
T148A†	T[148]A†	74.6	16.1	22%	7
K5A	K[5]A	55.0	0.3	1%	2
D64N	D[64]N	121.4	58.8	48%	2
D64A	D[64]A	129.4	36.3	28%	2
N167D	N[167]D	94.6	7.0	7%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
N167Q	N[167]Q	77.1	35.8	46%	4
S61A	S[61]A	84.6	35.6	42%	4
S53A	S[53]A	109.9	11.6	11%	3
T159A	T[159]A	100.9	1.2	1%	3
T169A	T[169]A	99.7	10.8	11%	3
T172A	T[172]A	96.2	22.1	23%	3
T179A	T[179]A	94.5	16.7	18%	3
Y155H	Y[155]H	93.9	15.8	17%	3
Y155Q	Y[155]Q	87.6	29.8	34%	3
S158A	S[158]A	107.7	0.4	0%	2
S158D	S[158]D	87.0	9.0	10%	2
S158E	S[158]E	96.0	14.1	15%	2
N157Q	N[157]Q	107.8	5.5	5%	2
D203N/F205T	D39N/F41T	74.3	19.5	26%	12
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	40.6	9.1	22%	5
K228N	K63N	72.5	25.5	35%	13
D85N/K228N	D[85]N/K63N	60.1	13.4	22%	6

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	76.5	15.8	21%	3
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	96.8	21.2	22%	3
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	73.7	3.7	5%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	76.2	6.4	8%	2
I251S	I86S	64.3	13.3	21%	13
D85N/I251S	D[85]N/I86S	51.5	15.3	30%	5
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	46.4	19.0	41%	5
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	90.9	41.2	45%	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	97.5	13.8	14%	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	56.4	17.5	31%	2
A262S	A95bS	99.2	19.9	20%	8
K413N	K243N	109.6	41.0	37%	5
E410N	E240N	46.2	21.5	47%	21
E410N*	E240N*	83.3	36.9	44%	11
E239N	E74N	78.3	29.5	38%	9
T241N/H243S	T76N/H78S	104.5	3.5	3%	2
K247N/N249S	K82N/N84S	75.0	15.4	21%	11

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	67.1	23.6	35%	4
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	84.0	9.7	12%	6
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	102.3	23.0	23%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	89.3	10.3	12%	3
L321N	L153N	118.5	10.6	9%	2
F314N/H315S	F145N/H147S	Sin Actividad	n.d.	n.d.	4
S319N/L321S	S151N/L153S	54.2	14.8	27%	3
N260S	N95S	83.4	27.5	33%	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	94.3	6.8	7%	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	130.6	78.1	60%	2
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	107.7	74.8	69%	2
Y284N	Y117N	59.8	23.5	39%	8
G317N	G149N	Sin Actividad	n.d.	n.d.	5
R318N/A320S	R150N/A152S	Sin Actividad	n.d.	n.d.	8
R318A	R150A	52.8	25.8	49%	3
R318E	R150E	33.6	10.3	31%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
R318Y	R150Y	40.7	7.6	19%	3
R312Q	R143Q	29.9	5.0	17%	3
R312A	R143A	61.6	16.9	27%	2
R312Y	R143Y	27.2	11.4	42%	2
R312L	R143L	28.8	0.6	2%	2
V202M	V38M	40.2	1.0	2%	2
V202Y	V38Y	70.6	2.3	3%	2
D203M	D39M	40.6	7.9	19%	5
D203Y	D39Y	58.0	19.5	34%	4
A204M	A40M	34.0	9.2	27%	5
A204Y	A40Y	39.5	10.3	26%	2
K400A/R403A	K230A/R233A	56.7	10.0	18%	2
K400E/R403E	K230E/R233E	Sin Actividad	n.d.	n.d.	4
R403A	R233A	46.4	5.2	11%	7
R403E	R233E	67.0	19.4	29%	6
K400A	K230A	74.6	22.1	30%	2
K400E	K230E	61.3	9.3	15%	2

ES 2 782 078 T3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
K293E	K126E	63.2	13.9	22%	2
K293A	K126A	73.7	35.2	48%	2
R333A	R165A	Sin Actividad	n.d.	n.d.	2
R333E	R165E	Sin Actividad	n.d.	n.d.	2
R338A	R170A	33.7	3.7	11%	2
R338E	R170E	28.7	9.0	31%	10
R338A/R403A	R170A/R233A	73.6	18.1	25%	6
R338E/R403E	R170E/R233E	51.9	11.9	23%	2
K293A/R403A	K126A/R233A	69.2	10.2	15%	2
K293E/R403E	K126E/R233E	104.1	31.0	30%	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	65.4	1.3	2%	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	50.0	15.1	30%	2
R318A/R403A	R150A/R233A	45.7	1.6	3%	2
R318E/R403E	R150E/R233E	75.3	47.7	63%	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	49.6	14.3	29%	21
R338E/E410N	R170E/E240N	12.6	4.2	33%	8
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	45.5	12.8	28%	7

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
D203N/F205T/K228N	D39N/F41 T/K63N	39.9	3.8	9%	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	45.5	12.0	26%	6
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	24.1	5.6	23%	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	38.5	9.9	26%	3
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	47.5	6.4	13%	4
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	51.1	10.7	21%	2
K228N/E410N	K63N/E240N	44.3	13.0	29%	10
K228N/R338E	K63N1R170E	23.1	3.0	13%	2
K228N/R338A	K63N/R170A	31.2	4.5	14%	2
K228N/R318Y	K63N/R 150Y	61.3	5.4	9%	5
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	59.2	4.9	8%	2
R403E/E410N	R233E/E240N	93.7	1.0	1%	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	14.2	4.3	30%	26
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	18.9	4.1	22%	4
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	16.0	4.8	30%	5
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	42.0	4.7	11%	4
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	88.3	12.4	14%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	45.5	12.2	27%	14
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	44.7	20.9	47%	5
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	38.5	16.1	42%	3
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	30.4	10.5	35%	4
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	50.7	4.5	9%	2
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R 150Y/R170E/R233E/E240N	48.0	2.1	4%	2
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	45.7	13.4	29%	6
R333S	R165S	605.9	317.5	52%	3
R338L	R170L	47.9	9.0	19%	3
K316N	K148N	62.5	15.6	25%	3
K316A	K148A	55.2	4.1	7%	3
K316E	K148E	110.5	25.1	23%	3
K316S	K148S	57.3	4.6	8%	3
K316M	K148M	26.0	16.7	64%	3
E239S	E74S	28.5	19.2	67%	3
E239A	E74A	55.4	18.4	33%	3
E239R	E74R	58.3	13.9	24%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
E239K	E74K	59.2	25.5	43%	3
H257F	H92F	62.0	30.1	49%	3
H257Y	H92Y	59.3	25.0	42%	3
H257E	H92E	59.7	39.6	66%	3
H257S	H92S	56.0	24.7	44%	3
T412A	T242A	76.1	44.7	59%	5
T412V	T242V	51.2	18.9	37%	8
E410N/T412A	E240N/T242A	37.2	3.6	10%	4
E410N/T412V	E240N/T242V	33.3	4.9	15%	4
E410Q	E240Q	56.1	18.0	32%	4
E410S	E240S	50.0	11.9	24%	12
E410A	E240A	47.7	11.7	24%	10
E410D	E240D	71.9	26.9	37%	4
N346D	N178D	45.7	7.8	17%	4
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	104.4	14.5	14%	2
N346Y	N178Y	27.4	4.2	15%	8
Y345A	Y177A	50.8	32.4	64%	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
Y345T	Y177T	28.6	7.9	28%	4
T343R	T175R	31.3	10.9	35%	9
T343E	T175E	27.3	10.0	37%	4
T343Q	T175Q	37.0	9.1	25%	3
F3421	F1741	30.0	19.1	64%	3
T343 R/Y345T	T175R/Y177T	26.5	6.8	26%	3
R318Y/R338E	R150Y/R170E	24.6	5.5	22%	4
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	30.9	4.8	16%	2
K228N/1251 S	K63N/186S	122.6	53.5	44%	2
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	36.1	14.0	39%	3
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	48.0	9.8	21%	2
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	39.3	9.8	25%	2
1251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	33.4	10.2	30%	4
D104N/K106S/1251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	46.2	7.7	17%	8
Y155F/1251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	43.3	7.0	16%	2
1251S/R318Y/R338E/E410N	186S/R150Y/R170E/E240N	16.2	1.8	11%	7
D104N/K106S/1251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/186S/R150Y/R170E/E240N	24.3	8.6	35%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
F314N/K316S	F145N/K148S	635.1	569.9	90%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	39.2	8.3	21%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	39.1	14.7	38%	6
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84 S/R150Y /R170E/R233E/E240N	39.7	4.5	11%	2
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	59.0	0.6	1%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	16.6	3.7	22%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	15.3	4.1	27%	7
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	35.1	12.4	35%	4
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	16.4	4.0	25%	8
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	94.5	27.0	29%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	75.3	26.4	35%	2
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	77.1	18.3	24%	5
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	79.2	27.6	35%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	55.8	15.8	28%	3
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	44.3	19.2	43%	4
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	33.5	4.8	14%	4
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	67.5	11.6	17%	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	23.5	5.3	22%	6
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	29.7	10.9	37%	4
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	72.4	20.2	28%	2
D104N/K106S/M260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/RI70E/R233E/E24ON	61.1	0.0	0%	2
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	83.9	4.4	5%	2
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	77.7	20.9	27%	2
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	100.0	15.6	16%	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	114.1	0.0	0%	2
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	96.5	5.5	6%	2
D 104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	61.2	14.1	23%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	68.5	33.2	49%	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	62.2	0.0	0%	2
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	127.9	6.2	5%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	22.3	5.0	23%	3
R338E/T343R	R170E/T175R	13.6	3.7	27%	4
† producido en células BHK-21; * 80% de forma glucosilada de E410N					

ES 2 782 078 T3

Tabla 19. Actividad catalítica de las variantes de FIXa (KM)

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
BeneFIX Benefix® Coagulación FIX (T148A)	BeneFIX Benefix® Coagulación FIX (T [148] A)	75.8	27.2	36%	140
FIXa purificada por plasma	FIXa purificada por plasma	73.3	26.8	37%	200
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	72.3	24.3	34%	33
N157D	N[157]D	121.8	53.0	44%	2
Y155F	Y[155]F	90.3	10.3	11%	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	80.4	2.5	3%	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	81.5	5.2	6%	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	88.0	22.5	26%	9
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	83.2	18.2	22%	9
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	91.9	20.2	22%	7
D85N	D[85]N	64.5	21.9	34%	17
T148A	T[148]A	70.1	26.9	38%	44
T148A†	T[148]A†	74.6	16.1	22%	7
K5A	K[5]A	65.4	26.8	41%	4
D64N	D[64]N	121.4	58.8	48%	2
D64A	D[64]A	129.4	36.3	28%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
N167D	N[167]D	94.6	7.0	7%	2
N167Q	N[167]Q	77.1	35.8	46%	4
S61A	S[61]A	84.6	35.6	42%	4
S53A	S[53]A	109.9	11.6	11%	3
T159A	T[159]A	100.9	1.2	1%	3
T169A	T[169]A	99.7	10.8	11%	3
T172A	T[172]A	96.2	22.1	23%	3
T179A	T[179]A	94.5	16.7	18%	3
Y155H	Y[155]H	93.9	15.8	17%	3
Y155Q	Y[155]Q	87.6	29.8	34%	3
S158A	S[158]A	107.7	0.4	0%	2
S158D	S[158]D	87.0	9.0	10%	2
S158E	S[158]E	96.0	14.1	15%	2
N157Q	N[157]Q	107.8	5.5	5%	2
D203N/F205T	D39N/F41T	74.3	19.5	26%	12
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	40.6	9.1	22%	5
K228N	K63N	72.5	25.5	35%	13

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
D85N/K228N	D[85]N/K63N	60.1	13.4	22%	6
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	76.5	15.8	21%	3
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	96.8	21.2	22%	3
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	73.7	3.7	5%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	76.2	6.4	8%	2
I251S	I86S	64.3	13.3	21%	13
D85N/I251 S	D[85]N/I86S	51.5	15.3	30%	5
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	46.4	19.0	41%	5
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	90.9	41.2	45%	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/186S	97.5	13.8	14%	2
Y155F/I251S	Y[155]F/186S	56.4	17.5	31%	2
A262S	A95bS	99.2	19.9	20%	8
K413N	K243N	106.3	40.4	38%	7
E410N	E240N	45.9	19.1	42%	27
E410N*	E240N*	85.2	38.1	45%	10
E239N	E74N	78.3	29.5	38%	9
T241N/H243S	T76N/H78S	104.5	3.5	3%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
K247N/N249S	K82N/N84S	75.0	15.4	21%	11
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	67.1	23.6	35%	4
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	84.0	9.7	12%	6
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	102.3	23.0	23%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	89.3	10.3	12%	3
L321N	L153N	118.5	10.6	9%	2
F314N/H315S	F145N/H147S	93.0	14.3	15%	2
K392N/K394S	K222N/K224S	0.0	n.d.	n.d.	0
S319N/L321S	S151N/L153S	54.2	14.8	27%	3
N260S	N95S	83.4	27.5	33%	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	94.3	6.8	7%	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	130.6	78.1	60%	2
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	107.7	74.8	69%	2
Y284N	Y117N	59.8	23.5	39%	8
G317N	G149N	104.6	n.d.	n.d.	1
R318N/A320S	R150N/A152S	84.5	21.2	25%	3
R318A	R150A	62.3	28.2	45%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
R318E	R150E	33.6	10.3	31%	3
R318Y	R150Y	40.7	7.6	19%	3
R312Q	R143Q	29.9	5.0	17%	3
R312A	R143A	61.6	16.9	27%	2
R312Y	R143Y	27.2	11.4	42%	2
R312L	R143L	28.8	0.6	2%	2
V202M	V38M	40.2	1.0	2%	2
V202Y	V38Y	70.6	2.3	3%	2
D203M	D39M	40.6	7.9	19%	5
D203Y	D39Y	58.0	19.5	34%	4
A204M	A40M	34.0	9.2	27%	5
A204Y	A40Y	39.5	10.3	26%	2
K400A/R403A	K230A/R233A	56.7	10.0	18%	2
K400E/R403E	K230E/R233E	137.1	68.4	50%	3
R403A	R233A	46.4	5.2	11%	7
R403E	R233E	67.0	19.4	29%	6
K400A	K230A	74.6	22.1	30%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
K400E	K230E	61.3	9.3	15%	2
K293E	K126E	63.2	13.9	22%	2
K293A	K126A	73.7	35.2	48%	2
R333A	R165A	406.7	117.5	29%	2
R333E	R165E	437.3	n.d.	n.d.	1
R338A	R170A	33.7	3.7	11%	2
R338E	R170E	28.7	9.0	31%	10
R338A/R403A	R170A/R233A	73.6	18.1	25%	6
R338E/R403E	R170E/R233E	51.9	11.9	23%	2
FC293A/R403A	K126A/R233A	69.2	10.2	15%	2
K293E/R403E	K126E/R233E	104.1	31.0	30%	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	65.4	1.3	2%	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	50.0	15.1	30%	2
R318A/R403A	R150A/R233A	45.7	1.6	3%	2
R318E/R403E	R150E/R233E	75.3	47.7	63%	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	49.6	14.3	29%	21
R338E/E410N	R170E/E240N	12.6	3.5	28%	12

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	36.7	12.2	33%	17
Y155F/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/R233E/E240N	33.6	8.6	26%	2
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	59.7	10.4	17%	3
Y155F/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E	67.1	27.9	42%	2
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	39.9	3.8	9%	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	45.5	12.0	26%	6
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	24.1	5.6	23%	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	38.5	9.9	26%	3
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	47.5	6.4	13%	4
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	51.1	10.7	21%	2
K228N/E410N	K63N/E240N	44.3	13.0	29%	10
K228N/R338E	K63N/R170E	23.1	3.0	13%	2
K228N/R338A	K63N/R170A	31.2	4.5	14%	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	61.3	5.4	9%	5
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	59.2	4.9	8%	2
R403E/E410N	R233E/E240N	93.7	1.0	1%	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	13.9	4.0	29%	42

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	18.9	4.1	22%	4
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	16.0	4.8	30%	5
K228N/R318Y/E4101N	K63N/R150Y/E240N	42.0	4.7	11%	4
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	94.2	21.1	22%	5
Y155F/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R233E/E240N	111.4	74.7	67%	2
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	43.2	13.8	32%	26
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	44.7	20.9	47%	5
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	38.5	16.1	42%	3
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	30.4	10.5	35%	4
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[I05]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	50.7	4.5	9%	2
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	48.0	2.1	4%	2
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	45.7	13.4	29%	6
R333S	R165S	605.9	317.5	52%	3
R338L	R170L	47.9	9.0	19%	3
K316N	K148N	62.5	15.6	25%	3
K316A	K148A	55.2	4.1	7%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
K316E	K148E	110.5	25.1	23%	3
K316S	K148S	57.3	4.6	8%	3
K316M	K148M	26.0	16.7	64%	3
E239S	E74S	28.5	19.2	67%	3
E239A	E74A	55.4	18.4	33%	3
E239R	E74R	58.3	13.9	24%	3
E239K	E74K	59.2	25.5	43%	3
H257F	H92F	62.0	30.1	49%	3
H257Y	H92Y	59.3	25.0	42%	3
H257E	H92E	59.7	39.6	66%	3
H257S	H92S	56.0	24.7	44%	3
T412A	T242A	76.1	44.7	59%	5
T412V	T242V	51.2	18.9	37%	8
E410N/T412A	E240N/T242A	37.2	3.6	10%	4
E410N/T412V	E240N/T242V	33.3	4.9	15%	4
E410Q	E240Q	56.1	18.0	32%	4
E410S	E240S	50.0	11.9	24%	12

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
E410A	E240A	47.7	11.7	24%	10
E410D	E240D	71.9	26.9	37%	4
N346D	N178D	45.7	7.8	17%	4
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	104.4	14.5	14%	2
N346Y	N178Y	27.4	4.2	15%	8
Y345A	Y177A	50.8	32.4	64%	4
Y345T	Y177T	28.6	7.9	28%	4
T343R	T175R	34.5	11.8	34%	12
T343E	T175E	27.3	10.0	37%	4
T343Q	T175Q	37.0	9.1	25%	3
F342I	F174I	30.0	19.1	64%	3
T343R/Y345T	T175R/Y177T	26.5	6.8	26%	3
R318Y/R338E	R150Y/R170E	24.6	5.5	22%	4
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	30.9	4.8	16%	2
K228N/I251S	K63N/I86S	122.6	53.5	44%	2
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	36.1	14.0	39%	3
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	40.8	15.0	37%	5

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	39.3	9.8	25%	2
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	33.4	10.2	30%	4
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	46.2	7.7	17%	8
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	43.3	7.0	16%	2
1251S/R318Y/R338E/E410N	186S/R150Y/R170E/E240N	16.1	2.7	17%	10
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	24.3	8.6	35%	3
F314N/K316S	F145N/K148S	635.1	569.9	90%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	39.2	8.3	21%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R10E/R233E/E240N	36.3	12.8	35%	10
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	28.0	9.5	34%	6
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	59.0	0.6	1%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	51.8	16.7	32%	6
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	16.6	3.7	22%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	14.7	3.9	27%	9
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	36.4	9.5	26%	7

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	16.4	4.0	25%	8
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	94.5	27.0	29%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[L06]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	75.3	26.4	35%	2
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	77.1	18.3	24%	5
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	79.2	27.6	35%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	49.7	15.6	31%	17
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	53.3	12.2	23%	7
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	45.4	17.7	39%	5
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	48.3	16.2	33%	6
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	34.4	10.0	29%	6
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	67.5	11.6	17%	4
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	23.5	5.3	22%	6
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	23.6	12.3	52%	11
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	72.4	20.2	28%	2
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	61.1	0.0	0%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	83.9	4.4	5%	2
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	77.7	20.9	27%	2
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	100.0	15.6	16%	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	114.1	0.0	0%	2
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	96.5	5.5	6%	2
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	61.2	14.1	23%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	68.5	33.2	49%	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	47.4	12.1	26%	6
Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	95.4	73.0	77%	5
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	127.9	6.2	5%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	24.7	7.2	29%	13
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	27.2	5.7	21%	4
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	26.6	5.0	19%	5
R338E/T343R	R170E/T175R	14.3	3.6	25%	7
T343R/N346Y	T175R/N178Y	26.0	7.3	28%	11
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/E240N	28.1	7.5	27%	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	15.8	4.0	25%	5
T343R/N346D	T175R/N178D	118.5	42.9	36%	2
R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/T75R/N178D/R233E/E240N	67.0	26.8	40%	2
R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	18.8	8.8	47%	6
R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/N178D/R233E/E240N	56.5	16.1	28%	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	67.3	17.7	26%	5
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	53.6	22.1	41%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	125.4	9.1	7%	3
K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	110.9	29.5	27%	10
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	48.7	11.4	23%	3
K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	25.0	7.9	31%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	44.3	11.0	25%	4
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E	34.0	8.7	26%	4
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	16.4	5.9	36%	16
Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/E240N	25.6	5.4	21%	4
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	93.9	14.0	15%	3
Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E/E240N	34.0	7.7	23%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	34.7	14.3	41%	2
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410 N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	25.9	8.2	32%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	25.7	8.4	33%	11
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	29.2	7.9	27%	5
K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	36.4	10.8	30%	7
Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	39.3	7.3	19%	5
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	32.1	10.3	32%	7
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	40.2	11.6	29%	5
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	25.1	5.4	21%	12
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	36.8	18.8	51%	5
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	28.9	9.1	31%	5
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	23.5	6.5	28%	2
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	23.9	3.1	13%	6
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	69.2	27.8	40%	6

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	19.6	3.4	17%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	19.0	6.4	33%	14
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	59.6	20.3	34%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	36.5	3.5	10%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	28.4	17.8	63%	4
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	26.4	1.3	5%	2
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/RI70E/T175R/R233E/E240N	25.1	3.0	12%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	26.3	8.8	33%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R	42.1	12.8	30%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E	108.6	22.3	21%	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/E240N	48.8	12.8	26%	3
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	40.9	12.9	31%	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	15.3	4.0	26%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	17.7	6.0	34%	4
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	32.8	22.9	70%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E41	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	60.6	26.0	43%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
0N					
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	80.5	31.3	39%	7
Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/E240N	17.7	7.6	43%	8
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	60.5	7.5	12%	2
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233F	105.3	25.8	25%	9
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	38.1	29.6	78%	4
K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	40.1	25.9	64%	4
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	25.1	2.8	11%	2
K247NN249S/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	26.3	3.5	13%	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	27.0	7.1	26%	2
K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	27.5	11.1	40%	5
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	52.0	5.4	10%	2
K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	60.0	13.9	23%	2
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	24.2	8.8	36%	7
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	30.0	1.5	5%	2
Y155F/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E	72.7	29.5	41%	2
Y155F/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/T175R/R233E/E240N	44.6	1.9	4%	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_M (nM)	±D.E. (nM)	%CV	n
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	27.6	13.2	48%	7
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	24.4	13.5	55%	4
Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240N	34.4	20.0	58%	5
Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R233E/E240N	131.3	53.1	40%	7
Y155F/R338E/T343R1E410N	Y[155]F/R170E/T175R/E240N	22.4	13.8	62%	6
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	35.5	15.9	45%	2
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	40.3	22.9	57%	4
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	52.3	2.4	5%	2
K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	40.3	9.6	24%	3
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	44.4	23.7	53%	3
K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	38.1	10.4	27%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403L/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	125.1	36.4	29%	3

† producido en células BHK-21; * 80% de forma glucosilada de E410N

Ejemplo 5.

Determinación de la inhibición de FIXa por el complejo antitrombina/heparina

La inhibición de las variantes FIXa o FIXa de tipo silvestre por el complejo antitrombina/heparina (AT-III/heparina) se evaluó midiendo el nivel de inhibición por varios concentraciones de AT-III/heparina en la actividad catalítica de FIXa hacia un sustrato de molécula pequeña, Mesil-D-CHG-Gly-Arg-AMC (Pefafluor FIXa; Pentapharm). Se determina un valor $K_{0.5}$ para cada variante FIXa probada, que corresponde a la concentración molar de AT-III que se requiere para una inhibición del 50% (IC_{50}) de la actividad catalítica de una variante de FIXa en las condiciones predefinidas del ensayo. Las reacciones de inhibición se realizaron en presencia de heparina de bajo peso molecular (LMWH; Calbiochem) o heparina no fraccionada de longitud completa (UFH; Calbiochem), la última requirió condiciones de protocolo modificadas para dar cuenta de un aumento en la tasa de inhibición. La constante de velocidad aparente de segundo orden (k_{app}) para la inhibición de las variantes FIXa o FIXa de tipo silvestre por el complejo AT-III/UFH también se evaluó directamente utilizando un protocolo modificado, en el que fue variado el tiempo de incubación con el complejo AT-III/UFH.

A. Inhibición de FIXa por el complejo Antitrombina/LMWH

Para reacciones de inhibición en presencia de LMWH, se preparó una solución 200 nM de AT-III/LMWH (LMWH 2 μM final) por dilución de una reserva de plasma de 20 μM. humana purificada AT-III (Molecular Innovations) en una solución de 2 μM de LMWH en 1.2 ml de volumen de 1 x Tampón (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, 10 mM $CaCl_2$, 0.01% de Tween-20, pH 7.4). Esta solución de AT-III/LMWH se usó como la concentración más alta en el ensayo. Las soluciones AT-III/LMWH se incubaron durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente y luego se diluyeron en serie 1.5 veces en una placa de polipropileno de 96 pozos profundos con un volumen final de 400 μl 1 × Tampón A que contenía LMWH 2 μM, lo que resultó en diluciones de 200 nM, 133.3, nM 88.9 nM, 59.3 nM, 39.5 nM, 26.3 nM, 17.6 nM y 0 nM (es decir, filas AH). Se dividieron en alícuotas un total de 25 μl en sus respectivas filas de una placa de almacenamiento con fondo en V de 96 pozos para llenar todas las columnas (es decir, 1-12). Las variantes de FIXa se diluyeron inicialmente a 100 nM en 1 × Tampón A. Posteriormente, se diluyeron 36 μl de cada variante FIXa 100 nM a una concentración de 1.8 nM en 2.0 ml de 1 × Tampón A y luego se dividieron en alícuotas partes de 60 μl de esta solución una placa de almacenamiento con fondo en V de 96 pozos de acuerdo con un mapa de placa predefinido (4 variantes FIXa por placa).

Las reacciones de ensayo se iniciaron usando un sistema de manejo de líquidos BioMek FX programado para dispensar 25 μl de las soluciones FIXa en las placas que contienen 25 μl de cada dilución de AT-III/LMWH por pozo para un total de dos placas de ensayo duplicadas para cada FIXa variante. Las condiciones finales del ensayo de inhibición fueron: diluciones 0.9 nM de FIXa y AT-III que varían de 0 a 100 nM en 1 μM de LMWH. Las reacciones de inhibición se incubaron adicionalmente durante 1 minuto a temperatura ambiente (~25°C) antes de que una alícuota de 25 μl de la reacción fuera transferida por el BioMek FX a una placa de media área negra de 96 pozos que contenía 25 μl de 1.6 mM de Mesil-D-Chg-Gly-Arg-AMC por pozo en tampón de ensayo B (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, 10 mM de $CaCl_2$, 0.01% Tween-20, pH 7.4, 60% de glicol de etileno). Se añadió polibreno (bromuro de hexadimetrina) a una concentración final de 5 mg/ml en el tampón B para extinguir la reacción de AT-III/LMWH. La actividad residual de FIXa se evaluó siguiendo las tasas iniciales de división del sustrato durante 60 minutos en un lector de fluorescencia ajustado a 25°C. Las condiciones finales del ensayo para la determinación de la actividad residual son 0.45 nM de variante FIXa, 0.8 mM de Mesil-D-CHG-Gly-Arg-AMC, 30% de etilenglicol y 5 mg/ml de polibreno en Tris 50 mM, NaCl 100 mM, 10 mM $CaCl_2$, 0.01% de Tween-20, pH 7.4.

Para determinar el grado de inhibición por AT-III/LMWH para las variantes FIXa o FIXa, los datos sin procesar recopilados con la aplicación SoftMax Pro (dispositivos moleculares) se exportaron como archivos .XML. Se realizaron análisis de datos no lineales adicionales con XLfit4, un paquete de software para ajuste automático de curvas y análisis estadístico dentro del entorno de hoja de cálculo de Microsoft Excel (software IDBS) o directamente dentro del paquete de software ActivityBase utilizando el módulo de análisis de datos XE Runner (software IDBS). La plantilla se usó para calcular la serie de diluciones de AT-III, la relación de AT-III a FIXa, y las relaciones de Vi/Vo para cada replicación de FIXa en cada concentración experimental de AT-III. La plantilla de hoja de cálculo se usó para calcular la serie de diluciones de AT-III, la relación de AT-III a FIXa, y las relaciones Vi/Vo para cada réplica de FIXa a cada concentración experimental de AT-III. Los análisis de regresión no lineal de la actividad residual de FIXa (expresada como Vi/Vo) versus la concentración de AT-III se procesaron utilizando XLfit4 y una ecuación de inhibición hiperbólica de la forma ((C+(Amp*(1- (X/($K_{0.5}$+X)))))); donde C = desplazamiento (fijado en 0 para permitir la extrapolación de conjuntos de datos que no alcanzaron el 100% de inhibición durante el curso del ensayo), Amp = la amplitud del ajuste y $K_{0.5}$, que corresponde a la concentración de AT-III requerida para la inhibición semimáxima en las condiciones del ensayo. Para varias variantes de FIXa, AT-III/LMWH inhibió menos del 10-15% de la actividad de proteasa total a la concentración más alta probada de AT-III, lo que representa un límite superior de detección para el ensayo en condiciones de detección estándar. Por lo tanto, a las variantes con menos del 10% de inhibición máxima se les asignó un límite inferior al valor $K_{0.5}$ de 999 nM y en la mayoría de los casos se espera que tengan resistencias AT-III mucho mayores que los valores informados.

La Tabla 20 proporciona los resultados de los ensayos que se realizaron con AT-III/LMWH. Los resultados se presentan tanto como el parámetro $K_{0.5}$ equipado y como una representación de la medida de la resistencia AT-III para cada variante en comparación con la FIXa de tipo silvestre expresada como una relación de sus valores $K_{0,5}$ ajustados (variante $K_{0.5}/K_{0.5}$ de tipo silvestre). Cuando el parámetro $K_{0.5}$ de la variante FIXa se comparó con el FIXa de tipo silvestre, se comparó con un polipéptido FIXa de tipo silvestre recombinante que se expresó y purificó usando las mismas condiciones que se usaron para los polipéptidos FIXa variantes para asegurar que cualquier diferencia en la actividad fue el resultado de las mutaciones, y no el resultado de diferencias en, por ejemplo, modificaciones posteriores a la traducción asociadas con diferentes sistemas de expresión. Por lo tanto, el polipéptido FIXa de tipo silvestre utilizado para la comparación fue el FIXa recombinante de tipo silvestre generado a partir de la clonación del gen FIX establecido en la SEQ ID NO: 1 y expresado a partir de células CHOX como un polipéptido con una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3, como se describe en el Ejemplo 1 (es decir, polipéptido Catalyst Biosciences WT FIX). Varias variantes de FIXa exhibieron una resistencia mayor a 20 veces mayor a AT-III en comparación con FIXa de tipo silvestre (Catalyst Biosciences WT FIXa). Por ejemplo, FIXa-R318A/R403A, FIXa-R318E/R340E, FIXa-R318A, FIXa-R318E, FIXa-K400E, FIXa-R338E/R403E y FIXa-K400A/R403A se encuentran entre el grupo que exhibió una resistencia significativa a AT-III.

Tabla 20. Inhibición de variantes FIXa por AT-III/LMWH

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	± D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-mut}}/^{0.5}$-wt	n
FIXa purificada por plasma FIXa purificada por	Plasma	20.2	6.7	33%	0.7	3
BeneFIX (T148A)	BeneFIX (T[148])	27.3	4.7	17%	0.9	2
Biociencias del	catalizador WT Biociencias del catalizador WT	29.4	7.3	25%	1.0	10
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	31.1	n/a	n/a	1.1	1
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	26.1	n/a	n/a	0.9	1
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	47.7	n/a	n/a	1.6	1
D85N	D[85]N	33.1	n/a	n/a	1.1	1
T148A	T[148]A	22.9	1.7	8%	0.8	4
D203N/F205T	D39N/F41T	154.1	50.1	33%	5.2	4
I251S	I86S	22.6	n/a	n/a	0.8	1
D85N/I251S	D[85]N/I86S	28.3	n/a	n/a	1.0	1
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	32.1	n/a	n/a	1.1	1
A262S	A95bS	25.3	n/a	n/a	0.9	1
K413N	K243N	34.2	n/a	n/a	1.2	1
E410N	E240N	24.8	7.8	31%	0.8	3
E239N	E74N	191.8	61.0	32%	6.5	3
T241N/H243S	T76N/H78S	35.4	n/a	n/a	1.2	1
K247N/N249S	K82N/N84S	23.1	n/a	n/a	0.8	1
L321N	L153N	39.0	n/a	n/a	1.3	1

F314N/H315S	F145N/H147S	191.8	59.8	31%	6.5	3
S319N/L321S	S151N/L153S	113.4	n/a	n/a	3.9	1
N260S	N95S	64.6	n/a	n/a	2.2	1
Y284N	Y117N	36.7	n/a	n/a	1.2	1
R318A	R150A	896.2	189.2	21%	30.5	2
R318E	R150E	861.1	21.8	3%	29.3	2
R318Y	R150Y	395.1	6.3	2%	13.5	2
R312Q	R143Q	52.7	5.1	10%	1.8	2
R312A	R143A	51.9	1.3	3%	1.8	2
R312Y	R143Y	323.0	13.7	4%	11.0	2
R312L	R143L	25.5	2.9	11%	0.9	2
V202M	V38M	20.3	5.1	25%	0.7	2
V202Y	V38Y	27.2	6.9	25%	0.9	2
D203M	D39M	18.6	6.9	37%	0.6	2
D203Y	D39Y	31.1	0.3	1%	1.1	2
A204Y	A40Y	43.4	22.3	51%	1.5	2
K400A/R403A	K230A/R233A	585.0	160.5	27%	19.9	2
K400E/R403E	K230E/R233E	299.0	206.5	69%	10.2	2
R403A	R233A	164.3	88.7	54%	5.6	2
R403E	R233E	264.2	80.9	31%	9.0	2
K400A	K230A	384.0	121.1	32%	13.1	2
K400E	K230E	614.8	71.4	12%	20.9	2
K293E	K126E	290.2	42.1	15%	9.9	2
K293A	K126A	194.1	38.0	20%	6.6	2
R333A	R165A	225.7	72.7	32%	7.7	2
R333E	R165E	345.6	1.7	0%	11.8	2
R338A	R170A	56.2	8.4	15%	1.9	2
R338E	R170E	238.4	n/a	n/a	8.1	1

R338A/R403A	R17/R233A	418.5	150.9	36%	14.2	2
R338E/R403E	R170E/R233E	601.6	241.5	40%	20.5	2
K293A/R403A	K126A/R233A	486.3	114.9	24%	16.6	2
K293E/R403E	K126E/R233E	342.0	4.9	1%	11.6	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	497.1	85.9	17%	16.9	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	418.5	150.9	36%	14.2	2
R318A/R403A	R150a/R233A	999.0	n/a	n/a	34.0	2
R318E/R403E	R150e/R233E	999.0	n/a	n/a	34.0	2
* Un valor $K_{0.5}$ de 999 nM indica el valor límite inferior para aquellas variantes con menos del 10% de inhibición en las condiciones del ensayo.						

B. Inhibición de FIXa por la Complejo antitrombina/UFH

Se realizaron los experimentos adicionales para evaluar la inhibición de la variantes FIXa por AT-III/UFH (heparina no fraccionada de longitud completa) usando el mismo ensayo como se describió anteriormente, con modificaciones menores. Se usó heparina no fraccionada de longitud completa (Calbiochem) en lugar de heparina de bajo peso molecular (LMWH) para observar los efectos de las mutaciones variantes de FIXa en el aumento de la velocidad de la reacción de inhibición debido al efecto “plantilla” proporcionado por cadenas de heparina más largas (ver, por ejemplo, Olson et al. (2004) Thromb Haemost 92(5), 929-939).

Para las reacciones de inhibición en presencia de UFH, se prepararon soluciones de AT-III/UFH de 70 nM, 600 nM, 2000 nM, 6000 o 10000 nM (UFH final 1 μM) por dilución de una reserva de 20 μM de plasma humana purificada AT-III (Molecular Innovations) en una solución de un exceso de UFH (2 a 20 μM) en un volumen de 1.4 ml de 1 x tampón A (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 10 mM, 0.01% de Tween-20, pH 7.4). Las soluciones AT-III/UFH también se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de diluirse en serie 1.5 veces en una placa de polipropileno de 96 pozos profundos con un volumen final de 460 μl 1 × Tampón A que contenía 1 μM de UFH. Las diluciones finales de AT-III para el ensayo modificado dependían de la concentración inicial de AT-III y oscilaban entre 70 nM - 0 nM, 600 nM - 0 nM, 100 nM - 0 nM o 5000 nM - 0 nM (es decir, filas AH). Esas variantes, que mostraron una mayor resistencia a la inhibición de AT-III en las condiciones estándar, se probaron adicionalmente usando concentraciones más altas de AT-III. Un total de 35 μl de cada dilución AT-III se dividió en partes alícuotas en sus respectivas filas de una placa de almacenamiento con fondo en V de 96 pozos para llenar todas las columnas (es decir, 1-12). Las variantes de FIXa se diluyeron inicialmente a 100 nM en 1 × Buffer A. Posteriormente, 15 μl de cada variante de 100 nM FIXa se diluyeron a una concentración de 0.6 nM en 2.0 ml de 1 × Tampón A y luego se dividieron en partes alícuotas de 70 μl de esta solución una placa de almacenamiento con fondo en V de 96 pozos de acuerdo con el mismo mapa de placa predefinido (4 variantes FIXa por placa).

Las reacciones de ensayo se iniciaron usando un sistema de manejo de líquidos BioMek FX programado para dispensar 35 μl de las soluciones de FIXa en las placas que contienen 35 μl de cada dilución de AT-III/heparina por pozo para un total de dos placas de ensayo duplicadas para cada FIXa variante. Las condiciones finales del ensayo de inhibición fueron: diluciones 0.3 nM de FIXa y AT-III que varían de 35 nM a 0 nM, 300 nM a 0 nM, 1000 nM a 0 nM, 3000 nM a 0 nM o 5000 nM a 0 nM en UFH que varían de 1 μM a 10 μM, dependiendo de la concentración más alta de AT-III para que la heparina permanezca en exceso. Las reacciones de inhibición se incubaron adicionalmente durante 10 segundos a temperatura ambiente (~25°C) antes de que una alícuota de 40 μl de la reacción se transfiriera por el BioMek FX a una placa de media área negra de 96 pozos que contenía 20 μl de Mesil-D-Chg-Gly-Arg-AMC 2.5 mM por pozo en tampón de ensayo C (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 10 mM, 0.01% de Tween-20, pH 7,4, 82% de glicol de etileno y 5 mg/ml de polibreno). Se añadió polibreno (bromuro de hexadimetrina) a una concentración final de 5 mg/ml al Tampón C para apagar la reacción AT-III/UFH. La actividad residual de FIXa se evaluó siguiendo las tasas iniciales de división del sustrato durante 60 minutos en un lector de fluorescencia ajustado a 25°C. Las condiciones finales del ensayo para la determinación de la actividad residual fueron la variante FIXa 0.2 nM, el Mesil-D-CHG-Gly-Arg-AMC 0.83 mM, el 30% de etilenglicol y el polibreno 5 mg/ml en Tris 50 mM, NaCl 100 mM, 10 mM $CaCl_2$, 0.01% de Tween-20, pH 7.4. Los análisis de datos se realizaron como se describió anteriormente para los ensayos de inhibición de AT-III/LMWH.

Como se encontró con LMWH, AT-III/UFH inhibió menos del 10-15% de la actividad de proteasa total para una serie de variantes de FIXa a las concentraciones más altas probadas de AT-III, lo que representa un límite superior de detección

para el ensayo en condiciones de detección estándar. Por lo tanto, a estas variantes con una inhibición máxima inferior al 10% se les asignó un límite inferior de valor $K_{0.5}$ de 999 nM y en la mayoría de los casos se espera que tengan resistencias AT-III mucho mayores que el valor informado. Varias variantes de FIXa que inicialmente recibieron un valor $K_{0.5}$ de 999 nM se volvieron a analizar a concentraciones más altas de AT-III, expandiendo la sensibilidad del ensayo y proporcionando niveles claros de resistencia a AT-III. Si estas variantes aún mantenían menos del 10% de inhibición máxima a las concentraciones más altas de AT-III de prueba (1000 nM a 5000 nM) se asignó un valor $K_{0.5}$ de límite inferior de 9999 nM, por lo tanto, se espera que estas variantes tengan muchas resistencias AT-III mayor que el valor informado.

Las tablas 21-22 proporcionan los resultados de los ensayos que se realizaron usando AT-III/UFH. La Tabla 22 refleja datos para variantes FIXa adicionales y proporciona nuevos promedios globales calculados para incluir réplicas experimentales adicionales (n) para variantes FIXa en la Tabla 21. Los resultados se presentan como el parámetro $K_{0.5}$ ajustado y como una representación de la extensión de la resistencia AT-III para cada variante en comparación con la FIXa de tipo silvestre expresada como una relación de sus valores $K_{0.5}$ ajustados (variante $K_{0.5}/K_{0.5}$ de tipo silvestre). Varias variantes de FIXa exhibieron una resistencia aumentada de más de 100 a 500 veces a AT-III en comparación con FIXa de tipo silvestre. Por ejemplo, FIXa-R318A/R403A, FIXa-R318A, FIXa-R318Y, FIXa-R338A/R403A FIXa-D203N/F205T/R318Y, FIXa- R318Y/R338E/R403E, FIXa- R318Y/R33, R3/R318/R3/R318/R318/R318 R338E/E410N, R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N y FIXa-R318Y/R403E/E410N se encuentran entre este grupo, que exhibieron una resistencia significativa a AT-III.

Tabla 21. Inhibición de variantes de FIXa por AT-III / UFH

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ko.s (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
BeneFIX Benefix® FIX de Coagulación (T148A)	BeneFIX Benefix® FIX de Coagulación(T [148] A)	18	8	44%	0.9	51
FIXa purificada por plasma	FIXa purificada por plasma	30	4	14%	1.6	5
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	19	7	34%	1.0	15
N157D	N[157]D	17	4	23%	0.9	2
Y155F	Y[155]F	13	0	1%	0.7	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	11	6	49%	0.6	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	6	2	33%	0.3	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	20	3	14%	1.0	2
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	20	2	9%	1.0	2
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	24	0	1%	1.2	2
D85N	D[85]N	17	3	15%	0.9	4
T148A	T[148]A	21	8	39%	1.1	10
K5A	K[5]A	22	3	15%	1.2	2
D64N	D[64]N	18	0	1%	0.9	2
D64A	D[64]A	16	2	12%	0.8	2
N167D	N[167]D	12	2	14%	0.6	2
N167Q	N[167]Q	12	1	8%	0.6	2
S61A	S[61]A	19	3	18%	1.0	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ko.s (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
S53A	S[53]A	27	4	16%	1.4	2
T159A	T[159]A	33	7	23%	1.7	2
T169A	T[169]A	17	6	36%	0.9	2
T172A	T[172]A	16	3	21%	0.8	2
T179A	T[179]A	24	2	7%	1.2	2
Y155H	Y[155]H	25	4	15%	1.3	2
Y155Q	Y[155]Q	23	0	1%	1.2	2
S158A	S[158]A	20	1	5%	1.0	2
S158D	S[158]D	15	2	16%	0.8	2
S158E	S[158]E	14	1	10%	0.7	2
N157Q	N[157]Q	16	2	11%	0.8	2
D203N/F205T	D39N/F41T	271	51	19%	14.0	5
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	587	65	11%	30.3	2
K228N	K63N	29	13	46%	1.5	6
D85N/K228N	D[85]N/K63N	34	3	7%	1.7	2
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	46	17	36%	2.4	2
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	41	21	52%	2.1	2
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	15	n.d.	n.d.	0.8	1
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[1O6]S/Y[155]F/K6 3N	49	5	9%	2.5	2
I251S	I86S	28	8	28%	1.4	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ko.s (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
D85N/I251S	D[85]N/I86S	19	6	30%	1.0	2
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	28	11	41%	1.4	2
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	42	14	33%	2.2	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	32	5	16%	1.6	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	18	3	19%	0.9	2
A262S	A95bS	25	5	21%	1.3	2
K413N	K243N	27	13	48%	1.4	2
E410N	E240N	9	2	27%	0.5	4
E239N	E74N	132	21	16%	6.8	2
T241N/H243S	T76N/H78S	21	12	56%	1.1	2
K247N/N249S	K82N/N84S	22	4	18%	1.1	4
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	13	3	24%	0.7	4
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	53	29	55%	2.7	4
D104N/K106 S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	19	2	9%	1.0	2
D104N/K106S/Y155F/K247N /N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K8 2N/N84S	27	2	9%	1.4	2
L321N	L153N	25	6	25%	1.3	2
F314N/H315S	F145N/H147S	104	27	26%	5.4	4
S319N/L321S	S151N/L153S	65	11	17%	3.4	2
N260S	N95S	312	283	91%	16.1	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	228	82	36%	11.8	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ko.s (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	77	16	21%	4.0	2
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	292	37	13%	15.1	2
Y284N	Y117N	41	25	63%	2.1	5
R318N/A320S	R150N/A152S	999	0	0%	51.7	2
R318A	R150A	4145	1297	31%	214.3	2
R318E	R150E	10000	0	0%	517.0	2
R318Y	R150Y	1976	430	22%	102.2	2
R312Q	R143Q	33	9	26%	1.7	2
R312A	R143A	31	0	1%	1.6	2
R312Y	R143Y	2499	350	14%	129.2	2
R312L	R143L	17	1	5%	0.9	2
V202M	V38M	14	2	14%	0.7	2
V202Y	V38Y	18	3	14%	0.9	2
D203M	D39M	11	0	1%	0.6	2
D203Y	D39Y	16	3	21%	0.8	2
A204M	A40M	29	3	9%	1.5	2
A204Y	A40Y	24	1	3%	1.2	2
K400A/R403A	K230A/R233A	999	0	0%	51.7	2
K400E/R403E	K230E/R233E	999	0	0%	51.7	2
R403A	R233A	190	34	18%	9.8	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ko.s (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
R403E	R233E	731	14	2%	37.8	2
K400A	K230A	114	3	3%	5.9	2
K400E	K230E	301	27	9%	15.6	2
K293E	K126E	187	25	13%	9.7	2
K293A	K126A	82	1	1%	4.2	2
R333A	R165A	235	54	23%	12.1	2
R333E	R165E	999	0	0%	51.7	2
R338A	R170A	33	3	10%	1.7	2
R338E	R170E	222	124	56%	11.5	8
R338A/R403A	R170A/R233A	328	106	32%	17.0	6
R338E/R403E	R170E/R233E	6000	1089	18%	310.2	2
K293A/R403A	K126A/R233A	999	0	0%	51.7	2
K293E/R403E	K126E/R233E	999	0	0%	51.7	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	999	0	0%	51.7	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	999	0	0%	51.7	2
R318A/R403A	R150A/R233A	999	0	0%	51.7	2
R318E/R403E	R150E/R233E	999	0	0%	51.7	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	607	164	27%	31.4	4
R338E/E410N	R170E/E240N	92	14	15%	4.7	4
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	2351	168	7%	121.5	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ko.s (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	10000	0	0%	517.0	7
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	822	69	8%	42.5	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	377	20	5%	19.5	2
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	1170	180	15%	60.5	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	423	61	14%	21.9	2
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	7226	133	2%	373.6	2
D203N/F205T/R33 8E/R403 E	D39N/F41T/R170E/R233E	1520	162	11%	78.6	2
K228N/E410N	K63N/E240N	36	7	20%	1.9	2
K228N/R338E	K63N/R170E	108	8	7%	5.6	2
K228N/R338A	K63N/R170A	51	7	14%	2.7	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	3414	73	2%	176.5	2
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	1679	239	14%	86.8	2
R403E/E410N	R233E/E240N	279	26	9%	14.4	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	3458	1033	30%	178.8	5
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	6328	4241	67%	327.2	4
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	1098	1095	100 %	56.8	7
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	475	83	17%	24.6	2
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	7072	1387	20%	365.6	2
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	5881	4757	81%	304.1	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ko.s (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	9193	1037	11%	475.3	4
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	1280	220	17%	66.2	2
R333S	R165S	720	67	9%	37.2	2
R338L	R170L	121	6	5%	6.3	2
K316N	K148N	56	2	4%	2.9	2
K316A	K148A	63	15	24%	3.2	2
K316E	K148E	183	2	1%	9.5	2
K316S	K148S	77	15	19%	4.0	2
K316M	K148M	9	2	24%	0.5	2
E239S	E74S	101	12	12%	5.2	2
E239A	E74A	30	14	47%	1.6	3
E239R	E74R	65	17	26%	3.3	2
E239K	E74K	19	4	22%	1.0	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ko.s (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
H257F	H92F	12	1	11%	0.6	2
H257Y	H92Y	20	2	12%	1.0	2
H257E	H92E	25	12	48%	1.3	3
H257S	H92S	23	21	89%	1.2	3
T412A	T242A	25	3	14%	1.3	4
T412V	T242V	23	4	16%	1.2	4
E410N/T412A	E240N/T242A	10	1	7%	0.5	2
E410N/T412V	E240N/T242V	11	3	24%	0.6	2
E410Q	E240Q	24	14	60%	1.2	4
E410S	E240S	26	16	63%	1.3	7
E410A	E240A	42	24	58%	2.2	6
E410D	E240D	41	2	5%	2.1	2
N346D	N178D	222	176	79%	11.5	5
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	223	102	46%	11.5	2
N346Y	N178Y	36	2	7%	1.9	4
Y345A	Y177A	96	87	90%	5.0	13
Y345T	Y177T	16	0	0%	0.8	2
T343R	T175R	7	1	10%	0.4	2
T343E	T175E	55	8	15%	2.8	2
T343Q	T175Q	13	3	25%	0.7	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ko.s (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
F342I	F174I	98	10	11%	5.1	2
T343R/Y345T	T175R/Y177T	6	0	4%	0.3	2
R318Y/R338E	R150Y/R170E	397	50	12%	20.5	2
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y 177T	6	0	2%	0.3	2
K228N/I251 S	K63N/I86S	73	16	22%	3.8	2
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	3
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	5855	3889	66%	302.7	7
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	8985	1436	16%	464.5	2
F314N/K316S	F145N/K148S	1221	505	41%	63.1	4
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	8076	2967	37%	417.6	9
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	3
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2497	772	31%	129.1	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ko.s (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-mut}}/K_{0.5\text{-wt}}$	n
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	1514	631	42%	78.3	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	3875	846	22%	200.4	2
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	5402	2785	52%	279.3	5
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	85	19	22%	4.4	2
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	32	12	37%	1.6	4
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	41	18	45%	2.1	10
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	27	6	22%	1.4	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	RI50Y/R170E/R233E/E240N/T242V	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	7661	3243	42%	396.1	9
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	10000	0	0%	517.0	2
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	Ko.s (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	9696	527	5%	501.3	3
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	157	38	24%	8.1	3
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	152	39	26%	7.9	3
D[104]N/K[106]S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	1262	40	3%	65.3	2
D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	692	84	12%	35.8	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5560	3872	70%	287.5	3
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	1382	477	35%	71.4	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
R338E/T343R	R170E/T175R	16	6	38%	0.8	2

* Un valor $K_{0.5}$ de 999 nM indica el valor límite inferior para aquellas variantes con menos del 10 % de inhibición en las condiciones del ensayo estándar (35 nM - 0 nM AT-III).
* Las variantes con> 50% de WT k_{cat}/K_M (ver Ejemplo 4, Tabla 14) y que inicialmente recibieron un valor $K_{0.5}$ de 999 nM se volvieron a analizar a concentraciones de AT-III más altas, expandiendo la sensibilidad del ensayo.
* Un valor $K_{0.5}$ de 9999 nM indica el valor límite inferior para aquellas variantes con menos del 10% de inhibición bajo las condiciones del ensayo de sensibilidad expandida (1000 nM - 0 nM AT-III y 5000 - 0 nM AT-III).

Tabla 22. Inhibición de variantes de FIXa por AT-III/UFH

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-mut}}/K_{0.5\text{-wt}}$	n
BeneFIX Benefix® FIX de Coagulación(T148A)	BeneFIX Benefix® FIX de Coagulación (T[148]A)	17	8	47%	0.9	55
Plasma Purified FIXa	Plasma Purified FIXa	30	4	14%	1.6	5
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	19	7	34%	1.0	15
N157D	N[157]D	17	4	23%	0.9	2
Y155F	Y[155]F	13	0	1%	0.7	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	11	6	49%	0.6	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	6	2	33%	0.3	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	20	3	14%	1.0	2
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	20	2	9%	1.0	2
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	24	0	1%	1.2	2
D85N	D[85]N	17	3	15%	0.9	4
T148A	T[148]A	17	10	56%	0.9	13
K5A	K[5]A	22	3	15%	1.2	2
D64N	D[64]N	18	0	1%	0.9	2
D64A	D[64]A	16	2	12%	0.8	2
N167D	N[167]D	12	2	14%	0.6	2
N167Q	N[167]Q	12	I	8%	0.6	2
S61A	S[61]A	19	3	18%	1.0	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-mut}}/K_{0.5\text{-wt}}$	n
S53A	S[53]A	27	4	16%	1.4	2
T159A	T[159]A	33	7	23%	1.7	2
T169A	T[169]A	17	6	36%	0.9	2
T172A	T[172]A	16	3	21%	0.8	2
T179A	T[179]A	24	2	7%	1.2	2
Y155H	Y[155]H	25	4	15%	1.3	2
Y155Q	Y[155]Q	23	0	1%	1.2	2
S158A	S[158]A	20	1	5%	1.0	2
S158D	S[158]D	15	2	16%	0.8	2
S158E	S[158]E	14	1	10%	0.7	2
N157Q	N[157]Q	16	2	11%	0.8	2
D203N/F205T	D39N/F41T	271	51	19%	14.0	5
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	587	65	11%	30.3	2
K228N	K63N	29	13	46%	1.5	6
D85N/K228N	D[85]N/K63N	34	3	7%	1.7	2
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	46	17	36%	2.4	2
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	41	21	52%	2.1	2
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	15	n.d.	n.d.	0.8	1
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	49	5	9%	2.5	2
I251S	I86S	28	8	28%	1.4	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-mut}}/K_{0.5\text{-wt}}$	n
D85N/I251S	D[85]N/I86S	19	6	30%	1.0	2
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	28	11	41%	1.4	2
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	42	14	33%	2.2	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	32	5	16%	1.6	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	18	3	19%	0.9	2
A262S	A95bS	25	5	21%	1.3	2
K413N	K243N	27	13	48%	1.4	2
E410N	E240N	8	2	25%	0.4	6
E239N	E74N	132	21	16%	6.8	2
T241N/H243S	T76N/H78S	21	12	56%	1.1	2
K247N/N249S	K82N/N84S	22	4	18%	1.1	4
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	13	3	24%	0.7	4
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	53	29	55%	2.7	4
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	19	2	9%	1.0	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	27	2	9%	1.4	2
L321N	L153N	25	6	25%	1.3	2
F314N/H315S	F145N/H147S	104	27	26%	5.4	4
S319N/L321S	S151N/L153S	65	11	17%	3.4	2
N260S	N95S	312	283	91%	16.1	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	228	82	36%	11.8	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-mut}}/K_{0.5\text{-wt}}$	n
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	77	16	21%	4.0	2
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	292	37	13%	15.1	2
Y284N	Y117N	41	25	63%	2.1	5
R318N/A320S	R150N/A152S	999	0	0%	51.7	2
R318A	R150A	4145	1297	31%	214.3	2
R318E	R150E	9999	0	0%	517.0	2
R318Y	R150Y	1976	430	22%	102.2	2
R312Q	R143Q	33	9	26%	1.7	2
R312A	R143A	31	0	1%	1.6	2
R312Y	R143Y	2499	350	14%	129.2	2
R312L	R143L	17	1	5%	0.9	2
V202M	V38M	14	2	14%	0.7	2
V202Y	V38Y	18	3	14%	0.9	2
D203M	D39M	11	0	1%	0.6	2
D203Y	D39Y	16	3	21%	0.8	2
A204M	A40M	29	3	9%	1.5	2
A204Y	A40Y	24	1	3%	1.2	2
K400A/R403A	K230A/R233A	999	0	0%	51.7	2
K400E/R403E	K230E/R233E	999	0	0%	51.7	2
R403A	R233A	190	34	18%	9.8	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
R403E	R233E	731	14	2%	37.8	2
K400A	K230A	114	3	3%	5.9	2
K400E	K230E	301	27	9%	15.6	2
K293E	K126E	187	25	13%	9.7	2
K293A	K126A	82	1	1%	4.2	2
R333A	R165A	235	54	23%	12.1	2
R333E	R165E	999	0	0%	51.7	2
R338A	R170A	33	3	10%	1.7	2
R338E	R170E	222	124	56%	11.5	8
R338A/R403A	R170A/R233A	328	106	32%	17.0	6
R338E/R403E	R170E/R233E	6000	1089	18%	310.2	2
K293A/R403A	K126A/R233A	999	0	0%	51.7	2
K293E/R403E	K126E/R233E	999	0	0%	51.7	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	999	0	0%	51.7	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	999	0	0%	51.7	2
R318A/R403A	R150A/R233A	999	0	0%	51.7	2
R318E/R403E	R150E/R233E	999	0	0%	51.7	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	607	164	27%	31.4	4
R338E/E410N	R170E/E240N	92	14	15%	4.7	4
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	2351	168	7%	121.5	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-mut}}/K_{0.5\text{-wt}}$	n
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	10000	0	0%	517.0	7
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	822	69	8%	42.5	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	377	20	5%	19.5	2
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	1170	180	15%	60.5	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	423	61	14%	21.9	2
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	7226	133	2%	373.6	2
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	1520	162	11%	78.6	2
K228N/E410N	K63N/E240N	36	7	20%	1.9	2
K228N/R338E	K63N/R170E	108	8	7%	5.6	2
K228N/R338A	K63N/R170A	51	7	14%	2.7	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	3414	73	2%	176.5	2
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	1679	239	14%	86.8	2
R403E/E410N	R233E/E240N	279	26	9%	14.4	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	3458	1033	30%	178.8	5
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	6328	4241	67%	327.2	4
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	1098	1095	100 %	56.8	7
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	475	83	17%	24.6	2
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	7072	1387	20%	365.6	2
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	5881	4757	81%	304.1	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	9193	1037	11%	475.3	4
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	1280	220	17%	66.2	2
R333S	R165S	720	67	9%	37.2	2
R338L	R170L	121	6	5%	6.3	2
K316N	K148N	56	2	4%	2.9	2
K316A	K148A	63	15	24%	3.2	2
K316E	K148E	183	2	1%	9.5	2
K316S	K148S	77	15	19%	4.0	2
K316M	K148M	9	2	24%	0.5	2
E239S	E74S	101	12	12%	5.2	2
E239A	E74A	30	14	47%	1.6	3
E239R	E74R	65	17	26%	3.3	2
E239K	E74K	19	4	22%	1.0	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-mut}}/K_{0.5\text{-wt}}$	n
H257F	H92F	12	1	11%	0.6	2
H257Y	H92Y	20	2	12%	1.0	2
H257E	H92E	25	12	48%	1.3	3
H257S	H92S	23	21	89%	1.2	3
T412A	T242A	25	3	14%	1.3	4
T412V	T242V	23	4	16%	1.2	4
E410N/T412A	E240N/T242A	10	1	7%	0.5	2
E410N/T412V	E240N/T242V	11	3	24%	0.6	2
E410Q	E240Q	24	14	60%	1.2	4
E410S	E240S	26	16	63%	1.3	7
E410A	E240A	42	24	58%	2.2	6
E410D	E240D	41	2	5%	2.1	2
N346D	N178D	222	176	79%	11.5	5
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	223	102	46%	11.5	2
N346Y	N178Y	36	2	7%	1.9	4
Y345A	Y177A	96	87	90%	5.0	13
Y345T	Y177T	16	0	0%	0.8	2
T343R	T175R	7	1	10%	0.4	2
T343E	T175E	55	8	15%	2.8	2
T343Q	T175Q	13	3	25%	0.7	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
F3421	F1741	98	10	11%	5.1	2
T343R/Y345T	T175R/Y177T	6	0	4%	0.3	2
R318Y/R338E	R150Y/R170E	397	50	12%	20.5	2
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	6	0	2%	0.3	2
K228N/I251S	K63N/I86S	73	16	22%	3.8	2
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	3
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
I25IS/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	5855	3889	66%	302.7	7
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	8985	1436	16%	464.5	2
F314N/K316S	F145N/K148S	1221	505	41%	63.1	4
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	8076	2967	37%	417.6	9
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	3
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2497	772	31%	129.1	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
DI04N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/RI50Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	1514	631	42%	78.3	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	3875	846	22%	200.4	2
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	5402	2785	52%	279.3	5
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	85	19	22%	4.4	2
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	32	12	37%	1.6	4
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	41	18	45%	2.1	10
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	27	6	22%	1.4	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	7661	3243	42%	396.1	9
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	4871	4173	86%	251.8	9
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	3
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	9696	527	5%	501.3	3

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-mut}}/K_{0.5\text{-wt}}$	n
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	157	38	24%	8.1	3
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	152	39	26%	7.9	3
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	1262	40	3%	65.3	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	692	84	12%	35.8	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5560	3872	70%	287.5	3
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	1382	477	35%	71.4	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	4
R338E/T343R	R170E/T175R	12	6	46%	0.6	4
T343R/N346Y	T175R/N178Y	3	1	32%	0.1	4
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R 403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
T343R/N346D	T175R/N178D	22	4	18%	1.1	2
R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/N178D/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2

* Un valor $K_{0.5}$ de 999 nM indica el valor límite inferior para aquellas variantes con menos del 10 % de inhibición en las condiciones del ensayo estándar (35 nM - 0 nM AT-III).

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{0.5}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-}mut}/K_{0.5\text{-}wt}$	n
* Las variantes con > 50 % de WT k_{cat}/K_M (ver Ejemplo 4, Tabla 14) y que inicialmente recibieron un valor $K_{0.5}$ de 999 nM se volvieron a analizar a concentraciones de AT-III más altas, expandiendo la sensibilidad del ensayo. * Un valor $K_{0.5}$ de 10000 nM indica el valor límite inferior para aquellas variantes con menos del 10 % de inhibición bajo las condiciones del ensayo de sensibilidad expandida (1000 nM - 0 nM AT-III y 5000 - 0 nM AT-III).						

C. Determinación de la constante de velocidad de segundo orden (k_{app}) para la inhibición de FIXa por el complejo antitrombina/UFH

Se realizaron experimentos adicionales para medir la constante de velocidad de segundo orden para la inhibición(k_{app}) de FIXa variantes por AT -III/UFH usando el mismo ensayo descrito anteriormente en el Ejemplo 5B con modificaciones menores. Este método es más adecuado para evaluar las constantes de velocidad de segundo orden para múltiples variantes al mismo tiempo que los métodos cinéticos o discontinuos competitivos tradicionales (véase, por ejemplo, Olson et al. (2004) Thromb Haemost 92 (5), 929-939).

Para las reacciones de inhibición en presencia de UFH, una solución de 1,000 nM de AT-III/UFH se prepararon por dilución de un 20 μM de reserva de plasma humano purificado AT-III (Molecular Innovations) en una solución de un exceso de UFH (2 μM) en un volumen de 1.0 ml de 1 x tampón a (Tris 50 mM, NaCl 100 mM 1.0 mM, $CaCl_2$ 10 mM, 0.01% de Tween-20, pH 7.4). Las soluciones AT-III/UFH se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de diluirse en serie 2.0 veces en una placa de polipropileno de 96 pozos profundos con un volumen final de 500 μl 1 × Tampón A que contenía UFH 2 μM. Las diluciones finales de AT-III para el ensayo modificado k_{app} de variaron de 500 nM - 0 nM (es decir, filas AH). Un total de 35 μl de cada dilución AT-III se dividió en partes alícuotas en sus respectivas filas de una placa de almacenamiento con fondo en V de 96 pozos para llenar todas las columnas (es decir, 1-12). Las variantes de FIXa se diluyeron inicialmente a 100 nM en 1 × Tampón A. Posteriormente, se diluyeron 50 μl de cada variante FIXa 100 nM a una concentración de 2.0 nM en 2.5 ml de 1 × Tampón A y luego se dividieron en partes alícuotas de 70 μL de esta solución una placa de almacenamiento con fondo en V de 96 pozos de acuerdo con el mismo mapa de placa predefinido que el anterior (4 variantes FIXa por placa).

Las reacciones de ensayo se iniciaron usando un sistema de manejo de líquidos BioMek FX programado para dispensar 35 μL de las soluciones de FIXa en las placas que contienen 35 μL de cada dilución de AT-III/UFH por pozo para un total de dos placas de ensayo duplicadas para cada FIXa variante. Las condiciones finales del ensayo de inhibición fueron: diluciones 1.0 nM de FIXa y AT-III que varían de 500 nM a 0 nM en UFH 1 μM, de modo que la heparina permaneció en exceso. Las reacciones de inhibición se incubaron adicionalmente varias veces a temperatura ambiente (~ 25°C) dependiendo de la tasa de inhibición esperada constante y ajustada de modo que se pudiera alcanzar >90% de inhibición a la concentración más alta de AT-III en el ensayo (500 nM). Los tiempos típicos de incubación se determinaron específicamente para cada variante, o clase de variantes, pero siguieron en general los tiempos de incubación indicados en la Tabla 23.

Tabla 23. Tiempos de Incubación de Ensayo basados en valores k_{app} esperados

k_{app} esperados ($M^{-1}s^{-1}$)	FIXa/ATIII incubación (s)
1.0E-07	10
1.0E-06	30
1.0E-05	120
1.0E-04	600
1.0E-03	3600
1.0E-02	7200

Tras el tiempo de incubación deseado una alícuota de 40 μl de la reacción se transfiere por el BioMek FX a una placa negra de media área de 96 pozos que contiene 20 μl de 2.5 mM mesilo-D-CHG-Gly-Arg-AMC por pozo en tampón de ensayo C (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 10 mM, 0.01% de Tween-20, pH 7.4, 82% de glicol de etileno y 5 mg/ml de polibreno). Se añadió polibreno (bromuro de hexadimetrina) a una concentración final de 5 mg/ml al Tampón C para apagar la reacción AT-III/UFH. La actividad residual de FIXa se evaluó siguiendo las tasas iniciales de división del sustrato durante 60 minutos en un lector de fluorescencia ajustado a 25 °C. Las condiciones finales del ensayo para la determinación de la actividad residual fueron 0.67 nM de la variante FIXa, 0.83 mM de mesil-D-CHG-Gly-Arg-AMC, 30% de etilenglicol y 5 mg/ml de polibreno en Tris 50 mM, NaCl 100 mM, 10 mM $CaCl_2$, 0.01% de Tween-20, pH 7.4. Los análisis de datos para calcular el valor $K_{0.5}$ se realizaron de manera similar a la descrita anteriormente para los ensayos de inhibición de AT-III/UFH en el Ejemplo B usando el paquete de software ActivityBase y el módulo de análisis de datos XE Runner (software IDBS). Utilizando la configuración del ensayo descrita en el Ejemplo 5B en condiciones de psuedo primer orden y probando varios tiempos de incubación, es posible calcular la constante de velocidad de segundo orden aparente para inhibición por AT-III (k_{app}) usando las siguientes ecuaciones:

Ecuación (1)

$$k_{app} = \frac{k_{obs}}{\left(\frac{[\text{AT-III}]}{\text{S.I.}}\right)}$$

Ecuación (2)

$$k_{obs} = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}}$$

Dado que el valor de ajuste para $K_{0.5}$ = [AT-III] en $t_{1/2}$ (definido por el tiempo del ensayo) todos los valores necesarios están disponibles para calcular k_{obs} y, por lo tanto, la k_{app} para la inhibición de una variante FIXa dada por AT-III. El valor k_{app} calculado no tiene en cuenta ningún efecto potencial de los cambios en la estequiometría de inhibición (S.I.), que recibe un valor constante de 1.2 en los cálculos actuales, ya que este valor refleja lo que típicamente se informa en la literatura (véase, por ejemplo, Olson et al. (2004) Thromb Haemost 92(5), 929-939).

La Tabla 24 proporciona los resultados de los ensayos de velocidad de segundo orden que se realizaron usando AT-III/UFH. Los resultados se presentan como el parámetro k_{app} ajustado y como una representación de la extensión de la resistencia AT-III para cada variante en comparación con el FIXa de tipo silvestre expresado como una relación de sus valores k_{app} ajustados (k_{app} de tipo silvestrevariante k_{app}). Varias variantes de FIXa exhibieron una resistencia mayor a 10,000 - 20,000 veces mayor a AT-III en comparación con FIXa de tipo silvestre. Por ejemplo, FIXa-R318A, FIXa-R318Y, FIXa-R338A/R403A, FIXa-R318Y/R338E/R403E, FIXa- R318Y/R338E/R403E, FIXa-K247N/N249S/R318Y/R338/R338/R338/R338/R338/R338/R403E, FIXa-K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N, FIXa- R318Y/R338E/E410N y FIXa- R318Y/R338E/R403E/E410N se encuentran entre este grupo, que mostraron una resistencia significativa a AT-III.

Tabla 24. Constante de tasa de segundo orden para inhibición por AT-III/UFH

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	$K_{app\text{-}wt}/k_{app\text{-}mut}$	n
BeneFIX Benefix® FIX de Coagulación(T148A)	BeneFIX Benefix® FIX de Coagulación(T [148] A)	1.6E+07	1.7E+07	105 %	1	8
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	2.4E+07	8.0E+06	33%	1	4
T148A	T[148]A	1.6E+07	1.1E+07	69%	I	4
D203N/F205T	D39N/F41T	8.1 E+05	5.3E+05	66%	30	3
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	2.7E+06	4.5E+05	17%	9	2
N260S	N95S	1.1 E+06	2.1E+04	2%	21	2
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	7.0E+06	1.9E+06	27%	3	3
R318A	R150A	6.9E+05	5.6E+04	8%	35	2
R318E	R150E	1.6E+04	1.2E+03	7%	1,452	2
R318Y	R150Y	6.4E+05	3.5E+05	55%	37	5
R312Y	R143Y	2.3E+05	4.5E+04	19%	102	3
R403A	R233A	1.4E+06	3.1E+05	23%	18	2
R403 E	R233E	1.1E+05	2.4E+04	21%	209	2
K400E	K230E	4.1E+05	3.3E+04	8%	58	2
K293E	K126E	1.2E+06	8.4E+04	7%	20	2
R338E	R170E	2.7E+05	1.7E+05	64%	88	3
R338A/R403A	R170A/R233A	8.4E+05	4.6E+04	5%	28	2
R338E/R403E	R170E/R233E	6.8E+04	1.9E+04	28%	353	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	$K_{app\text{-}wt}/k_{app\text{-}mut}$	n
K293A/R403A	K126A/R233A	8.1E+04	1.5E+04	18%	294	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	4.7E+04	7.9E+03	17%	511	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	3.1 E+04	6.3E+03	20%	768	2
R318A/R403A	R150A/R233A	1.7E+04	4.7E+03	27%	1,390	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	1.1 E+06	7.9E+03	1%	22	2
R338E/E410N	R170E/E240N	6.3E+06	7.4E+06	117 %	4	10
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	1.3E+05	1.5E+05	115 %	180	14
Y155F/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/R233E/E240N	3.2E+04	1.7E+03	5%	755	2
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	1.2E+03	9.9E+02	80%	19,396	7
Y155F/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E	1.0E+03	5.4E+01	5%	23,242	2
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	1.1E+06	3.7E+05	33%	21	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	2.0E+06	2.1E+05	10%	12	2
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	3.6E+05	2.8E+04	8%	66	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	8.6E+05	1.6E+05	18%	28	2
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	6.1E+04	2.0E+04	33%	391	2
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	2.0E+03	n.d.	n.d.	12,250	1
K228N/R318Y	K63N/R150Y	1.2E+06	2.1E+05	17%	19	2
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	4.2E+04	1.3E+04	31%	567	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	$K_{app\text{-}wt}/k_{app\text{-}mut}$	n
R403E/E410N	R233E/E240N	4.8E+06	2.5E+06	53%	5	5
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	2.8E+05	2.4E+05	85%	84	8
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	2.1E+05	4.2E+04	20%	113	2
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	4.5E+05	6.9E+04	15%	53	2
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	1.9E+06	n.d.	n.d.	12	I
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	2.8E+04	1.8E+04	63%	856	6
Y155F/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R233E/E240N	8.1 E+03	1.4E+02	2%	2,963	2
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	3.2E+03	2.0E+03	63%	7,385	6
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	2.6E+03	1.7E+02	7%	9,060	2
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E 240N	3.9E+03	1.6E+01	0%	6,154	2
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.2E+03	8.1E+02	25%	7,464	3
A103N/N105S/Y155F/R318 Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/ R150Y/R170E/R233E/E240 N	3.2E+03	6.7E+00	0%	7,531	2
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E41 0N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/ R233E/E240N	2.9E+03	1.8E+02	6%	8,147	2
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	5.3E+04	5.8E+03	11%	454	3
N346D	N178D	3.4E+06	1.6E+06	48%	7	4
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	4.0E+06	5.4E+05	13%	6	2
N346Y	N178Y	8.4E+05	n.d.	n.d.	28	1

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	$K_{app-wt}/k_{app-mut}$	n
Y345T	Y177T	1.8E+06	7.8E+03	0%	13	2
T343R	T175R	4.2E+06	1.0E+04	0%	6	2
T343Q	T175Q	2.1E+06	5.4E+05	25%	11	2
T343R/Y345T	T175R/Y177T	5.0E+06	1.8E+05	4%	5	2
R318Y/R338E	R150Y/R170E	6.2E+05	5.4E+04	9%	39	2
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	2.9E+03	2.2E+02	7%	8,212	2
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	4.6E+03	6.1E+02	13%	5,161	2
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.0E+03	3.2E+02	11%	7,932	2
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.0E+03	3.5E+02	12%	7,940	2
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.7E+03	8.4E+02	15%	4,225	2
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.3E+03	1.4E+02	4%	7,306	2
I251S/R318Y/R338E/E410 N	I86S/R150Y/R170E/E240N	2.4E+05	2.1E+05	89%	100	6
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/186S/R150Y/R170E/E240N	3.2E+03	4.5E+02	14%	7,567	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2.0E+03	1.0E+03	53%	12,122	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.6E+03	5.9E+02	37%	15,058	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	$K_{app-wt}/k_{app-mut}$	n
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E 410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.7E+03	2.4E+02	14%	14,063	3
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.1E+03	7.6E+02	24%	7,646	3
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.0E+03	2.8E+02	28%	23,776	6
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	8.6E+05	1.2E+05	14%	28	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	1.8E+05	2.2E+04	13%	136	2
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	1.6E+03	1.1E+03	64%	14,483	7
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	7.2E+05	4.8E+05	66%	33	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.1E+03	4.5E+02	41%	21,766	12
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R 403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.8E+02	3.3E+02	48%	35,018	4
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.1E+03	3.9E+01	4%	21,856	4
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	2.9E+03	5.4E+02	19%	8,296	5
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	3.8E+03	1.2E+03	31%	6,322	5
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	1.6E+03	3.8E+02	23%	14,529	2
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	3.5E+05	7.2E+04	21%	69	3
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	3.9E+05	2.6E+04	7%	61	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	$K_{app-wt}/k_{app-mut}$	n
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	4.4E+03	8.5E+02	19%	5,407	2
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2.1E+03	3.9E+02	18%	11,173	2
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2.1E+03	2.4E+02	11%	11,456	2
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	1.1 E+03	5.5E+02	49%	21,504	6
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	1.6E+03	6.6E+02	41%	14,831	3
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	1.7E+06	8.7E+04	5%	14	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	3.2E+06	2.1E+05	6%	7	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.3E+03	3.8E+02	30%	18,567	2
Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E4 10N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	4.3E+02	3.8E+00	1%	55,342	4
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	3.2E+04	2.2E+04	69%	749	6
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	8.6E+03	5.4E+03	63%	2,774	6
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	9.1E+03	2.4E+03	27%	2,636	4
R338E/T343R	R170E/T175R	3.4E+06	4.8E+05	14%	7	2
T343R/N346Y	T175R/N178Y	4.2E+06	4.0E+06	95%	6	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	$K_{app-wt}/K_{app-mut}$	n
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N 178Y/R233E/E240N	2.8E+03	4.4E+02	16%	8,498	2
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	1.1E+04	4.3E+03	37%	2,086	4
T343R/N346D	T175R/N178D	1.3E+06	2.3E+05	18%	18	2
R318Y/R33SE/T343R1N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/E240N	5.1E+03	3.7E+01	1%	4,726	2
R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	7.9E+03	1.2E+03	16%	3,015	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	8.1 E+02	1.6E+02	20%	29,512	4
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	3.1 E+02	2.1E+02	67%	76,373	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	7.3E+03	2.0E+01	0%	3,291	2
K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	2.7E+03	9.3E+02	35%	8,942	6
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	4.2E+04	4.3E+02	1%	572	2
K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	2.1E+04	1.5E+03	7%	1,148	2
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	5.8E+03	8.6E+02	15%	4,118	2
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E	2.8E+03	3.8E+02	14%	8,515	6
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	5.4E+05	3.2E+05	58%	44	8
Y155F/R318/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/RI50Y/R170E/T175R/E240N	7.8E+05	6.1E+05	79%	31	4
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	9.3E+04	1.2E+04	13%	257	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	$K_{app\text{-}wt}/K_{app\text{-}mut}$	n
Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R1R233E/E240N	5.5E+04	7.8E+03	14%	436	4
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	3.4E+05	2.7E+03	1%	70	2
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	2.8E+05	1.7E+04	6%	85	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	8.7E+03	1.9E+03	22%	2,733	8
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	9.6E+03	2.4E+03	25%	2,499	4
K228N/1251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K.63N/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	9.0E+02	2.2E+02	25%	26,598	4
Y155F/K228N/1251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.3E+03	2.8E+02	21%	17,778	6
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2.6E+03	5.6E+02	22%	9,317	4
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2.6E+03	6.6E+02	25%	9,148	4
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	5.3F+03	1.8E+03	34%	4,468	10
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2.2E+03	1.4E+03	62%	10,758	4
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	9.3E+04	1.2E+04	13%	257	4
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	1.9E+05	7.1E+02	0%	125	2
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R23 3E/E240S	2.2E+05	2.6E+04	12%	110	6

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	$K_{app\text{-}wt}/k_{app\text{-}mut}$	n
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	4.0E+04	7.6E+03	19%	601	4
Y155F/1251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/186S/R170E/T175R/R233 E	1.6E+05	1.5E+04	9%	146	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	9.9E+03	2.9E+03	30%	2,417	22
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	1.4E+05	2.3E+04	16%	168	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	2.3E+03	1.7E+02	8%	10,415	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	1.7E+03	2.0E+02	12%	14,156	4
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343 R/R403 E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233 E/E240N	8.9E+04	1.1E+04	13%	268	4
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	8.6E+04	1.1 E+04	13%	276	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	2.7E+04	1.4E+04	50%	889	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R	4.0E+05	2.9E+05	72%	60	8
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E	2.1 E+03	5.3E+01	2%	11,125	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/E240N	1.3E+05	9.5E+04	75%	188	6
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	1.3E+04	1.0E+03	8%	1,819	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	1.2E+07	6.2E+06	51%	2	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	2.2E+05	1.0E+05	45%	107	4
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	2.1 E+05	8.2E+04	39%	114	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	2.8E+04	5.6E+03	20%	842	4

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	$K_{app-wt}/k_{app-mut}$	n
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R 150Y/T175R/ R233E/E240N	2.5E+04	8.0E+03	32%	962	6
Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/E240N	2.9E+06	2.2E+06	77%	8	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/KS2N/N84S/R150Y/T175R/R233E	1.2E+04	1.0E+03	9%	2,011	4
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	9.8E+03	2.5E+03	26%	2,430	12
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343 R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	3.6E+05	1.2E+05	32%	66	4
K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	4.9E+04	6.5E+03	13%	487	4
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	4.4E+04	1.1 E+04	26%	549	4
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	5.0E+04	1.7E+04	35%	482	4
K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	K82N/NS4S/R170E/T175R/E240N	1.4E+07	7.2E+06	53%	2	5
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	6.2E+05	5.6E+04	9%	39	4
K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/T175/R/R233E/E240N	4.2E+05	8.1E+04	19%	58	4
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	4.4E+05	1.9E+05	43%	55	6
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	1.8E+06	8.6E+05	48%	13	4
Y155F/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E	1.1E+04	9.1E+02	8%	2,114	2
Y155F/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/T175R/R233E/E240N	8.8E+05	3.3E+03	0%	27	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175	3.7E+05	1.1E+05	28%	64	6

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	±D.E. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	$K_{app-wt}/k_{app-mut}$	n
	R					
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	3.2E+05	1.4E+05	44%	74	6
Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240N	3.5E+06	4.8E+05	14%	7	2
Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R233E/E240N	1.3E+05	3.3E+04	26%	191	14
Y155F/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/E240N	1.3E+07	1.0E+07	78%	2	6
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	2.0E+07	6.3E+06	31%	1	4
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	2.0E+05	5.9E+04	29%	118	4
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	1.2E+06	1.1E+05	9%	20	2
K228N/R150Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	7.1E+03	3.3E+02	5%	3,343 .	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	1.0E+03	2.3E+02	22%	23,389	2
K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	6.3E+05	1.0E+05	17%	38	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	1.7E+04	2.4E+03	14%	1,422	2

Ejemplo 6

Análisis farmacocinético y farmacodinámico de polipéptidos FIXa

Se evaluaron las propiedades farmacocinéticas (PK) y farmacodinámicas (PD) de los polipéptidos variantes FIXa midiendo la cantidad de FIX variante en plasma de ratón en diversos puntos temporales después de la administración intravenosa. Se usaron dos ensayos para cuantificar FIXa en plasma. Se usó un ELISA para cuantificar la proteína FIX total en plasma de ratón para evaluar las propiedades farmacocinéticas, y se usó un ensayo de coagulación dependiente de FIX (tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) usando plasma empobrecido en FIX) para cuantificar la actividad coagulante de polipéptidos FIX en plasma, evaluando así las propiedades farmacodinámicas.

Animales**.** Ratones machos CD-I (30-40 g), suministrados por Charles River Laboratories (Hollister, CA) fueron puestos en cuarentena durante al menos 3 días antes del tratamiento. Para los estudios de PK en serie, los ratones machos CD-1 (30-37 g) fueron equipados con una cánula venosa yugular permanente. El agua del grifo filtrada y la comida estaban disponibles *ad libitum* antes de su uso en experimentos de PD o PK.

A. Dosificación y recolección de sangre

A los ratones (N=3 por punto de tiempo) se les administraron los polipéptidos FIX por vía intravenosa (~1.4 mg/kg para estudios de PK y ~400 UI/kg para estudios de DP, volumen de dosis 2 ml/kg) a través de la vena de la cola. En el momento apropiado después de la dosificación, los animales se anestesiaron y se extrajo sangre (0.5-1 ml) usando punción cardíaca terminal en jeringas que contenían citrato. En algunos experimentos en los que había disponible una cantidad insuficiente de proteínas, se utilizó un total de solo 4-6 animales para la hemorragia en serie en puntos de tiempo escalonados; Se usaron dos ratones para cada curso de tiempo completo para recolectar todos los puntos de tiempo sin eliminar el exceso de volumen de sangre. Se tomaron muestras de sangre en animales conscientes restringidos al eliminar primero una pequeña cantidad de sangre en una jeringa de 0.1 ml que contenía solución salina al 0.9%. Luego se unió una jeringa que contenía 4.5 μl de citrato de sodio 0.1 M y se extrajeron 0.05 ml de sangre en la jeringa y la sangre se transfirió a un tubo de 1.5 ml. La jeringa inicial se volvió a unir y 0.07 ml de solución salina se empujó hacia atrás a través de la cánula. La cánula se tapó hasta el siguiente punto de tiempo, cuando se repitió el proceso. Para todos los estudios, las muestras de sangre se centrifugaron dentro de los 15 minutos de la recolección (9000 rpm, 8 minutos, 4°C) y el plasma se retiró e inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido y luego se almacenó congelado (-70°C) en espera de análisis.

A. Evaluación de PK.

Se recogieron muestras de sangre citratada en diversos momentos hasta 1440 min después de la dosis (es decir, Predosis, 2, 4, 10, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 960 y 1440 min) por punción cardíaca para experimentos terminales o catéter permanente para experimentos en serie. Las concentraciones plasmáticas de rFIX se determinaron usando un ELISA específico de factor IX utilizando un par de anticuerpos de detección y captura (# FIX-EIA, Affinity Biologicals, Ancaster, ON). Brevemente, un anticuerpo policlonal purificado por afinidad para FIX se reviste sobre los pozos de una placa. Las placas se lavan y se aplican muestras de plasma que contienen FIX. Las muestras de plasma se diluyen 1:750 y 1:1500 en la placa. Después de lavar la placa para eliminar el material no unido, se agrega un anticuerpo de detección conjugado con peroxidasa para FIX a la placa para unirse al FIX capturado. Después de lavar la placa para eliminar el anticuerpo conjugado no unido, la actividad de peroxidasa se expresa mediante incubación con sustrato quimioluminiscente y se lee a 425 nM en un lector de placa En Vision. La curva estándar es lineal en todo el rango de concentración y abarca las concentraciones de 0.82 pg/ml a 30 ng/ml. La variante FIX en sí misma se usa para la curva estándar para eliminar las diferencias en la afinidad del anticuerpo. Cada muestra se mide en dos placas de ensayo separadas y esas mediciones dentro del rango de la curva estándar se usan para calcular la concentración de variantes FIX en la muestra de plasma.

Evaluación de PD. La actividad farmacodinámica plasmática de rFIX se cuantificó utilizando un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) y plasma humano deficiente en FIX (kit STACLOT CK PERST, Diagnostica Stago, Asnières, Francia) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, el ensayo aPTT implica la recalcificación del plasma en presencia de cefalina (sustituto de plaquetas) y activador (koalina). Usando plasma humano deficiente en FIX, el ensayo aPTT es específico para FIX. El ensayo aPTT se realizó como se describe en el prospecto del producto del fabricante. Brevemente, se recogieron muestras de sangre citratadas en los mismos puntos de tiempo descritos para la evaluación de PK. Las muestras de plasma se diluyeron 1:100 en solución salina tamponada con Tris que contenía albúmina de suero bovino al 0.1% (Probumin, Millipore, Billerica, MA). El plasma diluido o estándar se combinó con plasma humano deficiente en FIX y reactivo de cefalina/caolín y se incubó durante 180 segundos. La coagulación se inició mediante la adición de calcio ($CaCl_2$). El tiempo de coagulación en segundos se midió utilizando un instrumento STArt4 (Diagnostica Stago, Asnières, Francia). Usando una curva estándar hecha de concentraciones conocidas de rFIX, las concentraciones plasmáticas de FIX se interpolaron a partir de la concentración logarítmica VS. el tiempo de registro de la curva estándar y luego la actividad FIX de fondo (de los animales antes de la dosis) se restaron. El límite inferior de cuantificación para la actividad del factor IX fue ~10 ng/ml.

Análisis de datos PD y PK. Los parámetros PD (aPTT) y PK (ELISA) de estudios en ratones con variantes de rFIX se calcularon usando análisis no compartimental en WinNonLin (v5.1, Pharsight Corp., Mountain View, CA). Tanto la PD como la PK de las variantes de rFIX siguieron la aparente descomposición plasmática biexponencial. Los parámetros seleccionados para cada variante probada se proporcionan en la Tabla 25 para PD (usando el ensayo aPTT) y las Tablas 26-27 para PK (usando el ensayo ELISA). La Tabla 26 refleja los datos para variantes FIXa adicionales y proporciona nuevos promedios globales calculados para incluir réplicas experimentales adicionales (n) para las variantes FIXa en la Tabla 26. Los parámetros PD incluyeron la vida útil (terminal, min), MRT ($MRT_{0\text{-inf}}$, min), Área bajo la curva (AUC) 0-último (min. μg/ml)/Dosis (mg/kg); Concentración máxima (C_{max}; (μg/ml)/Dosis (μg/kg), Vd (ml/kg) y Depuración (Cl, ml/min/kg).

Definiciones y fórmulas utilizadas para calcular los parámetros farmacocinéticos.

Vida útil de plasma (la vida útil del polipéptido FIX durante la fase terminal del perfil de concentración plasmática FIX en función del tiempo; $T_{½\beta}$ (calculado como -ln2 dividido por la pendiente negativa durante la fase terminal de la gráfica logarítmica lineal de la curva de concentración de plasma versus tiempo FIX); $MRT_{0\text{-último}}$ es el tiempo medio que el polipéptido FIX reside en el cuerpo; calculado como $AUMC_{0\text{- último}}/AUC_{0\text{-último}}$, donde $AUMC_{0\text{- último}}$ es el área total bajo la curva del primer momento versus tiempo y AUC como se describió posteriormente); $AUC_{0\text{- último}}$/Dosis se calcula como [AUC ($_{0\text{-t}}$)], donde t es el último punto de tiempo con concentración plasmática medible del polipéptido FIX dividido por la dosis IV (mg/kg); $AUC_{0\text{-inf}}$/ Dosis se calcula como [$AUC_{(0\text{-t})}$+ Ct/(ln2/$T_{½\beta}$), donde t es el último punto de tiempo con una concentración plasmática medible del polipéptido FIX dividido por la dosis IV (mg/kg); $C_{máx}$/Dosis (ug/ml por mg/kg), donde $C_{máx}$ es el tiempo posterior a la dosis correspondiente a la concentración máxima medida de FIX en plasma; Cl es la depuración sistémica calculada como (Dosis/$AUC_{0\text{-inf}}$); V_{ss} es el volumen de distribución en estado estacionario; calculado como MRT*Cl; y V_z es el volumen de distribución basado en la constante de eliminación terminal (β); calculado como Cl/(ln2/$T_{½\beta}$).

Tabla 25. Propiedades de PD de variantes FIX evaluadas mediante el ensayo aPTT

Mutación (numeración FIX madura)	N	$T_{1/2\beta}$	$MRT_{0\text{-inf}}$	$C_{máx}$/ dosis	$AUC_{0\text{-inf}}$	Cl	Vz	Vss
BeneFIX ® Coagulation FIX (T148A)	2	296	354	19.3	2641	0.41	169	142

Tabla 26. Propiedades de PK de las variantes FIX evaluadas por ELISA

Mutación	N	T1/2$_\beta$	MRT 0-inf	Cmáx / Dosis	AUC / Dosis 0-última	AUC / Dosis 0-inf	Vz	Cl
BeneFIX ® FIX de Coagulación(T148A)	3	314 ± 128	366 ± 105	9.1 ± 1.5	1298 ± 298	1522 ± 158	308 ± 160	0.74 ± 0.06
T148A	8	383 ± 109	435 ± 128	10.2± 2.1	1620 ± 195	1747 ± 234	317± 82	0.58 ± 0.08
Catalyst Biosciences WT	2	329	360	11.9	2036	2121	229	0.48
A103N/N105S	2	375	481	12.5	2841	3068	177	0.33
D104N/K106S	2	428	558	13.9	3379	3786	164	0.26
K106N/V108S	2	510	629	12.8	2748	3202	234	0.32
D85N	2	528	607	9.5	1798	2046	372	0.49
D64N	2	447	519	11.8	1933	2152	304	0.47
D64A	2	364	372	11.5	1351	1466	359	0.68
N167D	2	334	318	8.9	1129	1176	410	0.85
N167Q	3	337 ± 8.8	323 ± 4.2	8.2 ± 1.2	1495 ± 258	1554 ± 268	318 ± 42	0.66 ± 0.10
S61A	2	397	412	10.0	1685	1800	325	0.57
S53A	2	382	462	11.2	2146	2321	238	0.43
T159A	2	232	227	10.5	1036	1048	315	0.97
T169A	2	348	319	8.3	836	889	567	1.15
T172A	3	494 ± 187	571 ± 214	11.2 ± 2.9	2055 ± 408	2366 ± 676	295 ± 31	0.45 ± 0.13
T179A	2	377	431	12.5	2291	2458	223	0.42

Mutación	N	$T1/2_{\beta}$	MRT 0-inf	Cmáx / Dosis	AUC / Dosis 0-última	AUC / Dosis 0-inf	Vz	Cl
Y155H	2	465	552	11.6	2365	2638	253	0.38
Y155Q	1	552	645	13.6	2583	3045	262	0.33
S158E	2	433	471	14.5	2029	2222	291	0.46
N157Q	2	335	352	11.3	1185	1238	395	0.83
N157D	2	290	265	9.9	1166	1211	393	0.93
Y155F	2	443	567	18.1	3941	4375	149	0.23
A103N/N105S/Y155F	2	562	619	13.1	2427	2496	325	0.40
D104N/K106S/Y155F	3	514 ± 80	581 ± 81	13.8 ± 1.0	3057 ± 1032	3181 ± 989	243 ± 47	0.34 ± 0.13
D203N/F205T	3	481 ± 69	566± 29	9.4 ± 1.9	2028± 448	2289 ± 489	314 ± 91	0.45 ± 0.09
D203N/F205T/D85N	1	291	406	12.4	1538	2044	205	0.49
K228N/D85N	2	459	565	11.3	2616	2926	227	0.35
K228N/A103N/N105S	2	583	701	14.4	3032	3301	255	0.30
K228N/D104N/K106S	2	801	913	13.6	2050	2238	513	0.45
K228N/Y155F	2	626	679	8.6	2073	2149	431	0.47
K228N/D104N/K106S/Y155F	2	551	614	14.0	3730	3822	211	0.27
1251S	2	565	718	10.1	2646	3137	260	0.32
1251S/A103N/N105S	2	444	542	14.3	2445	2719	241	0.38
1251S/D104N/K106S	2	692	802	13.9	2533	2664	375	0.38
1251S/Y155F	2	572	660	12.2	2591	2790	291	0.37

Mutación	N	$T1/2_{\beta}$	MRT 0-inf	Cmáx / Dosis	AUC / Dosis 0-última	AUC / Dosis 0-inf	Vz	Cl
A262S	3	373 ± 87	453 ± 91	14.4 ± 3.8	2716 ± 732	2926 ± 908	188 ± 29	0.36 ± 0.10
E410N*	2	439	551	7.4	893	1365	469	0.75
E239N	2	338	416	10.7	1657	1908	257	0.54
K247NIN249S	6	627 ± 174	734 ± 244	10.8 ± 3.4	2196 ± 737	2545 ± 795	387 ± 154	0.42 ± 0.11
Y155F/K247N/N249S	2	538	608	10.6	1752	1880	420	0.53
K247N/N249S/A103N/N105S	2	736	852	21.5	4369	4699	226	0.21
K247N/N249S/D104N/K106S /Y155F	2	603	714	16.8	3744	3889	233	0.27
S319N/L321S	2	351	427	11.4	2270	2409	210	0.42
N260S	3	496 ± 157	619 ± 170	11.5 ± 3.8	3364 ± 1300	3687 ± 1457	231 ± 156	0.30 ± 0.11
D104N/K106S/N260S	2	805	1001	16.1	4736	5248	220	0.20
YI55F/N260S	2	607	682	18.4	3408	3530	257	0.27
Y284N	2	400	478	9.0	2052	2210	270	0.46
R318Y/E410N	1	428	474	6.1	575	686	900	1.46
R338E/E410N	2	334	376	6.2	718	844	570	1.18
R338E/R403E/E4100N	5	436 ± 24	507 ± 29	13.4± 2.0	3052 ± 522	3302 ± 656	196 ± 49	0.31 ± 0.06
D203N/F205T/E240N	2	600	679	6.8	671	799	1080	1.25
D203N/F205T/R338E	2	307	419	9.3	1186	1586	281	0.63
D203N/F205T/R338A	2	317	403	9.0	1063	1397	327	0.72

Mutación	N	$T1/2_{\beta}$	MRT 0-inf	Cmáx / Dosis	AUC / Dosis 0-última	AUC / Dosis 0-inf	Vz	Cl
D203N/F205T/R318Y	2	258	286	8.7	508	601	732	1.91
D203N/F205T/R338E/R403E	2	303	419	11.3	2105	2804	156	0.36
K228N/E410N	2	373	479	6.0	721	1025	522	0.98
K228N/R338E	2	248	340	10.4	1403	1736	207	0.58
R318Y/R338E/E410N	5	424 ± 306	515 ± 378	5.8 ± 1.6	645 ± 310	774 ± 454	778 ± 272	1.6 ± 0.73
R318Y/R338E/E410N/D104N /K106S	2	502	531	8.9	2008	2041	355	0.49
R318Y/R338E/E410N/Y155F	2	555	584	6.5	678	721	1136	1.53
K228N/R318Y/E410N	1	304	408	6.0	686	906	485	1.10
R318Y/R338E/R403E/E410N	5	442 ± 22	534 ± 28	16.4 ± 3.7	3902 ± 867	4232 ± 996	157 ± 38	0.25 ± 0.05
A103N/N105S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	2	421	527	16.2	3605	3935	157	0.26
D104N/K106S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	2	417	517	15.1	3114	3392	183	0.30
Y155F/R318Y/R338E/R403E/ E410N	2	565	649	12.4	3687	3772	226	0.27
R318Y/R338E/R403E/E410N/ A103N/N105S/Y155F	3	669 ± 145	819 ± 223	17.2 ± 2.0	5844 ± 1064	6204 ± 1393	156 ± 8.7	0.17 ± 0.04
R318Y/R338E/R403E/E410N/ D104N/K106S/Y155F	2	472	575	14.4	5885	5967	114	0.17
D203N/F205T/R318Y/E410N	1	431	475	8.0	637	761	816	1.31
R338L	2	368	377	11.2	1761	1861	285	0.54

Mutación	N	$T1/2_{\beta}$	MRT 0-inf	Cmáx / Dosis	AUC / Dosis 0-última	AUC / Dosis 0-inf	Vz	Cl
K316M	2	527	665	7.9	1846	2142	356	0.47
E239S	2	462	542	11.3	2184	2416	278	0.41
E239A	2	538	544	13.1	1973	2209	353	0.45
E239R	2	431	709	8.9	1668	2020	307	0.50
E239K	2	400	370	14.4	2107	2222	278	0.48
H257F	2	328	357	10.3	1689	1820	273	0.70
H257Y	2	352	353	13.6	1971	2063	245	0.49
H257E	2	491	520	10.9	2185	2411	294	0.42
H257S	2	435	511	8.2	1630	1769	358	0.57
T412A	2	473	539	7.1	1561	1756	379	0.58
T412V	2	579	665	8.3	1258	1454	565	0.69
E410N/T412A	2	461	514	2.8	364	398	1679	2.51
E410N/T412V	2	340	390	3.7	431	487	906	2.27
E410Q	2	276	283	7.2	445	484	836	2.19
E410S	2	310	286	7.2	753	775	587	1.32
E410A	2	363	328	8.6	528	554	946	1.81
E410D	2	348	377	9.2	1473	1596	320	0.63
N346D	2	349	395	13.3	2817	2956	170	0.34
Y155F/N346D	2	472	478	17.0	3934	3986	176	0.26
N346Y	2	329	325	11.7	1246	1297	365	0.77

Mutación	N	$T1/2_{\beta}$	MRT 0-inf	Cmáx / Dosis	AUC / Dosis 0-última	AUC / Dosis 0-inf	Vz	Cl
Y345T	2	359	453	6.1	1124	1200	438	0.85
T343R	2	402	504	6.5	1143	1234	487	0.85
T343E	2	414	461	12.6	1740	1877	318	0.53
T343Q	2	434	442	9.0	1626	1737	408	0.63
F342I	2	400	476	8.3	1133	1224	491	0.88
T343R/Y345T	2	325	324	9.1	1094	1130	422	0.90
R318Y/R338E	2	340	313	11.2	1402	1452	336	0.69
K228N/I251S	2	586	657	11.3	1473	1588	551	0.65
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	476	647	9.1	2400	2726	261	0.37
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N/Y155F	3	615 ± 135	750 ± 191	18.6 ± 2.1	5496 ± 2044	5970 ± 2260	158 ± 50	0.18 ± 0.06
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N/D85N	2	587	713	24.8	6153	6725	125	0.15
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	3	412 ± 140	542 ± 181	15.7 ± 4.9	2306 ± 884	2636 ± 1261	242 ± 89	0.44 ± 0.17
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	4	687 ± 60	874 ± 82	17.2 ± 2.2	7653 ± 456	8127 ± 520	122 ± 10	0.12 ± 0.01
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N/Y155F	2	492	620	19.9	5704	6510	110	0.15
I251S/R318Y/R338E/E410N	2	591	630	7.5	1245	1292	664	0.78
D104N/K106S/D104N/K106S /I251S/R318Y/R338E/E410N/	2	726	819	16.4	1512	1612	650	0.62

Mutación	N	$T1/2_{\beta}$	MRT 0-inf	Cmáx / Dosis	AUC / Dosis 0-última	AUC / Dosis 0-inf	Vz	Cl
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	637	807	15.4	5283	5541	170	0.18
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	613	758	13.8	5335	5549	160	0.18
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	615	783	18.6	7319	7612	117	0.13
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	626	754	19.4	6332	6580	140	0.15
K228N/N84S/R318Y/R338E/E410N	2	512	539	18.1	1925	1967	396	0.54
Y155F/K228N/N84S/R318Y/R338E/E410N	2	617	685	8.1	1170	1221	745	0.83
R318Y/R338E/R403E/E410S	2	382	395	14.7	2897	2971	184	0.34
R318Y/R338E/E410S	2	356	326	7.7	488	511	1066	2.08
K228N/K247N/N249S	2	662	753	19.6	3390	3578	268	0.28
K228N/K247N/N249S/D104N/K106S/Y155F	3	781 ± 55	939 ± 48	18.5 ± 3.8	6111 ± 1900	6606 ± 1949	183 ± 63	0.16 ± 0.04
K228N/K247N/N249S/D104N/K106S	2	758	838	17.9	3792	4035	271	0.25
K228N/K247N/N249S/Y155F	2	549	643	17.2	3002	3269	246	0.31
I251S/R318Y/R338E/R403E/	3	599 ±	753 ±	21.7 ±	8567+	9233 ±	96.6 ±	0.11 ±
E410N/Y155F		89	121	3.2	2834	2860	15.4	0.03
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	2	424	456	20.0	4730	4892	124	0.20
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	2	380	439	17.5	4994	5115	107	0.20

Mutación	N	$T1/2_{\beta}$	MRT 0-inf	Cmáx / Dosis	AUC / Dosis 0-última	AUC / Dosis 0-inf	Vz	Cl
R318Y/R338E/R403E/T412A	3	399 ± 88	477 ± 108	19.7 ± 0.7	4320 ± 2385	4505 ± 2357	144 ± 48	0.27 ± 0.15
R318Y/R3380E/T412A	2	462	401	13.6	1674	1691	398	0.60
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	583	743	23.9	6821	7488	111	0.13
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	779	999	17.2	7100	7728	145	0.12
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	628	758	21.4	5214	5465	167	0.21
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	2	474	575	25.2	7623	8140	86	0.12
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	2	540	641	18.2	5039	5172	154	0.20
K247N/N249S/N260S	2	549	632	17.4	4156	4262	186	0.23
Y155F/K247N/N249S/N260S	2	691	814	24.0	3857	4085	244	0.22
D 104N/K106S/K247N/N249S/N260S	2	712	859	16.5	4187	4458	235	0.23
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	2	680	856	23.3	7026	7423	134	0.14
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	691	875	18.9	6353	6737	149	0.13
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	2	531	560	20.5	3766	3862	200	0.27
R338E/T343R	2	534	453	12.8	798	813	949	1.23

* 80 % de forma glucosilada de E410N

Tabla 27. Propiedades PK de variantes FIX evaluadas por ELISA

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
N157D	N[157]D	2	290	1166	1211	265	9.9	393	0.93
YI55F	Y[155]F	2	443	3941	4375	567	18.1	149	0.23
A103N/N105S/ Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	2	562	2427	2496	619	13.1	325	0.40
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	3	514 ± 79.8	3060 ± 1030	3180 ± 989	581 ± 81.0	13.8 ± 1.02	243 ± 47.4	0.341 ± 0.128
WT	Catalyst Biosciences WT	2	329	2036	2121	360	11.9	229	0.48
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	2	375	2841	3068	481	12.5	177	0.33
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	2	428	3379	3786	558	13.9	164	0.26
K106N/V108S	K[1061N/V[108]S	2	510	2748	3202	629	12.8	234	0.32
D85N	D[85]N	4	575 ± 89.3	1530 ± 321	1680 ± 83.3	623 ± 83.3	9.10 ± 0.518	528 ± 184	0.619 ± 0.156
T148A	BeneFIX, T[148]A	3	314 ± 128	1300 ± 298	1520 ± 158	366 ± 105	9.12 ± 1.52	308 ± 160	0.662 ± 0.071
T148A	T[148]A	8	383 ± 109	1620 ± 195	1750 ± 234	435 ± 128	10.2 ± 2.09	317 ± 82.3	0.582 ± 0.084
K5A	K[5]A	2	271	1548	1583	311	10.5	251	0.64
D64N	D[64]N	2	447	1933	2152	519	11.8	304	0.47
D64A	D[64]A	2	364	1351	1466	372	11.5	359	0.68

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
N167D	N[167]D	2	334	1129	1176	318	8.9	410	0.85
N167Q	N[167] Q	3	337 ± 8.75	1500 ± 258	1550 ± 268	323 ± 4.25	8.20 ± 1.17	318 ± 42.5	0.655 ± 0.103
S61A	S[61]A	2	397	1685	1800	412	10.0	325	0.57
S53A	S[53]A	2	382	2146	2321	462	11.2	238	0.43
T159A	T[159]A	2	232	1036	1048	227	10.5	315	0.97
T169A	T[169]A	2	348	836	889	319	8.3	567	1.15
T172A	T[172]A	3	494 ± 187	2050 ± 408	237 ± 676	571 ± 214	11.2 ± 2.89	295 ± 31.5	0.447 ± 0.132
T179A	T[179]A	2	377	2291	2458	431	12.5	223	0.42
Y155H	Y[155]H	2	465	2365	2638	552	11.6	253	0.38
Y155Q	Y[155]Q	1	552	2583	3045	645	13.6	262	0.33
S158E	S[158]E	2	433	2029	2222	471	14.5	291	0.46
N157Q	N[157]Q	2	335	1185	1238	352	11.3	395	0.83
D203N/F205T	D39N/F41T	3	481 ± 69.0	2030 ± 448	2290 ± 489	566 ± 28.6	9.43 ± 1.93	314 ± 91.3	0.449 ± 0.087
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	1	291	1538	2044	406	12.4	205	0.49
K228N	K63N	3	490 ± 57.8	2340 ± 519	2570 ± 682	570 ± 27.9	12.3 ± 1.58	296 ± 119	0.410 ± 0.118
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	2	583	3032	3301	701	14.4	255	0.30

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	2	801	2050	2238	913	13.6	513	0.45
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	2	626	2073	2149	679	8.6	431	0.47
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	2	551	3730	3822	614	14.0	211	0.27
I251S	I86S	2	565	2646	3137	718	10.1	260	0.32
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	2	444	2445	2719	542	14.3	241	0.38
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	2	692	2533	2664	802	13.9	375	0.38
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	2	572	2591	2790	660	12.2	291	0.37
A262S	A95bS	2	373	2716	2926	453	14.4	188	0.36
E410N	E240N	2	439	893	1365	551	7.4	469	0.75
E239N	E74N	2	338	1657	1908	416	10.7	257	0.54
K247N/N249S	K82N/N84S	6	627 ± 174	2200 ± 737	2540 ± 795	734 ± 244	10.8 ± 3.41	387 ± 154	0.420 ± 0.106
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	2	538	1752	1880	608	10.6	420	0.53
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	2	736	4369	4699	852	21.5	226	0.21
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	2	571	2052	2109	632	16.2	426	0.51
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[1	2	603	3744	3889	714	16.8	233	0.27

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
/K247N/N249S	55]F/K82N/N84S								
S319N/L321S	S151N/L153S	2	351	2270	2409	427	11.4	210	0.42
N260S	N95S	3	496 ± 157	3360 ± 1300	3690 ± 1460	619 ± 170	11.5 ± 3.18	231 ± 156	0.295 ± 0.105
D104N/K106S/N260S	D[104]N/ K[106]S/N95S	2	805	4736	5248	1001	16.1	220	0.20
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	2	607	3408	3530	682	18.4	257	0.27
Y284N	Y117N	2	400	2052	2210	478	9.0	270	0.46
R318Y/E410N	R150Y/E240N	1	428	575	686	474	6.1	900	1.46
R338E/E410N	R170E/E240N	2	334	718	844	376	6.2	570	1.18
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	5	436 ± 24.4	3050 ± 522	3300 ± 656	507 ± 28.9	13.4 ± 2.03	196 ± 49.2	0.312 ± 0.063
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	2	600	671	799	679	6.8	1080	1.25
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	2	307	1186	1586	419	9.3	281	0.63
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	2	317	1063	1397	403	9.0	327	0.72
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	2	258	508	601	286	8.7	732	1.91
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	2	303	2105	2804	419	11.3	156	0.36
K228N/E410N	K63N/E240N	2	373	721	1025	479	6.0	522	0.98

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
K228N/R338E	K63N/R170E	2	248	1403	1736	340	10.4	207	0.58
R318Y/R338E/E410N	R150Y/E240N/R170E	5	424 ± 306	645 ± 310	774 ± 454	515 ± 378	5.78 ± 1.56	778 ± 272	1.62 ± 0.730
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N/	2	502	2008	2041	531	8.9	355	0.49
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	2	555	678	721	584	6.5	1136	1.53
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	1	304	686	906	408	6.0	485	1.10
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	5	442 ± 22.1	3900 ± 867	4230 ± 996	534 ± 28.0	16.4 ± 3.72	157 ± 38.3	0.246 ± 0.051
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2	421	3605	3935	527	16.2	157	0.26
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2	417	3114	3392	517	15.1	183	0.30
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	2	565	3687	3772	649	12.4	226	0.27
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/ E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	3	669 ± 145	5840 ± 1060	6200 ± 1390	819 ± 223	17.2 ± 2.02	156 ± 8.74	0.167 ± 0.039

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	2	472	5885	5967	575	14.4	114	0.17
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	1	431	637	761	475	8.0	816	1.31
R338L	R170L	2	368	1761	1861	377	11.2	285	0.54
K316M	K148M	2	527	1846	2142	665	7.9	356	0.47
E239S	E74S	2	462	2184	2416	542	11.3	278	0.41
E239A	E74A	2	538	1973	2209	544	13.1	353	0.45
E239R	E74R	2	431	1668	2020	709	8.9	307	0.50
E239K	E74K	2	400	2107	2222	370	14.4	278	0.48
H257F	H92F	2	328	1689	1820	357	10.3	273	0.70
H257Y	H92Y	2	352	1971	2063	353	13.6	245	0.49
H257E	H92E	2	491	2185	2411	520	10.9	294	0.42
H257S	H92S	2	435	1630	1769	511	8.2	358	0.57
T412A	T242A	2	473	1561	1756	539	7.1	379	0.58
T412V	T242V	2	579	1258	1454	665	8.3	565	0.69
E410N/T412A	E240N/T242A	2	461	364	398	514	2.8	1679	2.51
E410N/T412V	E240N/T242V	2	340	431	487	390	3.7	906	2.27
E410Q	E240Q	2	276	445	484	283	7.2	836	2.19
E410S	E240S	2	310	753	775	286	7.2	587	1.32

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
E410A	E240A	2	363	528	554	328	8.6	946	1.81
E410D	E240D	2	348	1473	1596	377	9.2	320	0.63
N346D	N178D	2	349	2817	2956	395	13.3	170	0.34
Y155F/N346D	178D/Y[155]F	2	472	3934	3986	478	17.0	176	0.26
N346Y	NI78Y	2	329	1246	1297	325	11.7	365	0.77
Y345T	Y177T	2	359	1124	1200	453	6.1	438	0.85
T343R	Y175R	2	402	1143	1234	504	6.5	487	0.85
T343E	T175E	2	414	1740	1877	461	12.6	318	0.53
T343Q	Y175Q	2	434	1626	1737	442	9.0	408	0.63
F342I	F174I	2	400	1133	1224	476	8.3	491	0.88
T343R/Y345T	T175R/Y177T	2	325	1094	1130	324	9.1	422	0.90
R318Y/R338E	R150Y/R170E	2	340	1402	1452	313	11.2	336	0.69
K228N/1251S	K63N/186S	2	586	1473	1588	657	11.3	551	0.65
K228N/R318Y/R338E /R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/ R233E/E240N	2	476	2400	2726	647	9.1	261	0.37
Y155F/K228N/R318Y /R338E/R403E/E410 N	Y[155]F/K63N/ R150Y/R170E/R233E/ E240N	3	615 ± 135	5500 ± 2040	5970 ± 2260	750 ± 191	18.6 ± 2.14	158 ± 50.1	0.183 ± 0.062
D85N/K228N/R318Y /R338E/R403E/E410 N	D[85]N/K63N/ R150Y/R170E/R233E/ E240N	2	587	6153	6725	713	24.8	125	0.15

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3	412 ± 140	2310 ± 884	2640 ± 1260	542 ± 181	15.7 ± 4.89	242 ± 89.4	0.438 ± 0.171
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	4	687 ± 60.2	7650 ± 456	8130 ± 520	874 ± 81.7	17.2 ± 2.24	122 ± 10.1	0.123 ± 0.008
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2	492	5704	6510	620	19.9	110	0.15
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	2	591	1245	1292	630	7.5	664	0.78
D104N/K106S/I51S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]SI86S/R150Y/R170E/E240N	2	726	1512	1612	819	16.4	650	0.62
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2	637	5283	5541	807	15.4	170	0.18
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2	613	5335	5549	758	13.8	160	0.18
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]SK82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N/	2	615	7319	7612	783	18.6	117	0.13

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]SK82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N/	2	626	6332	6580	754	19.4	140	0.15
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2	846	8069	8807	1020	18.4	139	0.11
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	2	512	1925	1967	539	18.1	396	0.54
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N/	2	617	1170	1221	685	8.1	745	0.83
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	2	382	2897	2971	395	14.7	184	0.34
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	2	356	488	511	326	7.7	1066	2.08
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	2	662	3390	3578	753	19.6	268	0.28
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	3	781 ± 55.2	6110 ± 1900	6610 ± 1950	939 ± 48.2	18.5 ± 3.84	183 ± 63.3	0.160 ± 0.045
DI04N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	2	758	3792	4035	838	17.9	271	0.25
Y155F/K228N/K247N	Y[155]F/K63N/K82N/	2	549	3002	3269	643	17.2	246	0.31

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
/N249S	N84S								
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	Y[155]F/I86S/R150Y/ R170E/R233E/E240N/	3	599 ± 88.6	8570 ± 2830	9230 ± 2860	753 ± 120	21.7 ± 3.19	96.6 ± 15.4	0.115 ± 0.030
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3	806 ± 88.6	9330 ± 2830	9990 ± 2860	912 ± 120	24.4 ± 3.19	116 ± 15.4	0.100 ± 0.030
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1	559	10704	11042	710	27.3	73	0.09
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	2	424	4730	4892	456	20.0	124	0.20
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	2	380	4994	5115	439	17.5	107	0.20
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	3	399 ± 88.1	4320 ± 2380	4500 ± 2360	477 ± 108	19.7 ± 0.684	144 ± 47.8	0.270 ± 0.145
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	2	462	1674	1691	401	13.6	398	0.60
R318Y/R338E/E410N/T412V	150Y/R170E/E240N/T242V	2	251	524	555	226	16.3	772	2.31
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2	583	6821	7488	743	23.9	111	0.13
D104N/K106S/N260	D[104]N/K[106]S/N95	2	779	7100	7728	999	17.2	145	0.12

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
S/R318Y/R338E/R403E/E410N	S/R150Y/R170E/R233E/E240N								
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2	628	5214	5465	758	21.4	167	0.21
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	2	474	7623	8140	575	25.2	86	0.12
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	2	540	5039	5172	641	18.2	154	0.20
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	2	549	4156	4262	632	17.4	186	0.23
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	2	691	3857	4085	814	24.0	244	0.22
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	2	712	4187	4458	859	16.5	235	0.23
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82NN84S/N95S/	2	680	7026	7423	856	23.3	134	0.14
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2	691	6353	6737	875	18.9	149	0.13
Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/R338	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R	1	1038	8401	9376	1068	21.0	160	0.11

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
E/R403E/E410N	233E/E240N								
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	T175R/R233E/E240N/RI50Y/R170E	2	531	3766	3862	560	20.5	200	0.27
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/A170E/T175R/R233E/E240N	1	182	3223	4335	259	20.5	61	0.23
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	3	666 ± 89.9	7270 ± 729	7550 ± 708	699 ± 88.0	21.7 ± 4.71	128 ± 21.1	0.133 ± 0.013
R338E/T343R	R170E/T175R	2	534	798	813	453	12.8	949	1.23
T343R/N346Y	T175R/N178Y	3	276 ± 19.9	1080 ± 331	1100 ± 333	228 ± 7.76	12.3 ± 5.14	394 ± 156	0.989 + 0.360
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/E240N	2	324	2394	2487	335	24.7	189	0.40
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	2	303	3569	3691	329	22.2	118	0.27
T343R/N346D	T175R/N178D	2	388	2903	2917	356	17.0	192	0.34
R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/E240N	2	450	6645	6717	506	20.7	97	0.15
R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	1	475	4989	5058	511	22.3	135	0.20

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/N178D/R233E/E240N	2	492	6249	6347	607	22.1	112	0.16
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N8451ZIS0YIR170E/R233E	2	622	10477	10973	791	26.9	85	0.10
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	2	805	8099	8569	814	20.0	137	0.12
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	2	618	9233	9709	801	22.4	92	0.10
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	2	421	6107	6153	473	19.9	99	0.16
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	2	529	793	815	391	5.6	931	1.23
R150Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	2	431	5020	5060	434	20.7	130	0.21
R170E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	2	484	5008	5060	450	19.8	141	0.20
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	2	628	5406	5509	521	17.9	164	0.18
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2	513	9067	9267	642	24.7	82	0.11

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2	536	8604	8824	672	24.4	89	0.12
Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2	780	9033	9557	854	20.5	123	0.11
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2	539	8325	8537	675	24.0	92	0.12
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	1	578	3266	6295	733	20.4	133	0.16
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2	753	8972	9391	757	26.0	117	0.11
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	2	503	5350	5412	506	16.7	135	0.19
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	2	589	5447	5546	526	22.9	156	0.18
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	2	485	9590	9749	619	24.0	74	0.10
Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	2	732	7531	7926	807	21.0	134	0.13
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R/	2	618	4657	4728	466	19.9	199	0.23

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	N	Terminal T1/2	AUC / Dosis (0-última)	AUC / Dosis (0-inf)	MRT (0-inf)	Cmáx / Dosis	Vz	Cl
/R403E/E410S	R233E/E240S								
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	2	866	7007	7391	751	18.3	169	0.14
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	2	804	9554	10051	776	20.4	116	0.10
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	2	662	2965	3048	578	13.6	313	0.33
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	1	717	8404	8790	783	16.9	118	0.11
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	2	676	7455	7702	676	20.3	131	0.13
K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	2	680	7758	8085	747	18.0	122	0.13

Ejemplo 7

Evaluación *in vivo* de la actividad procoagulante del polipéptido FIX

Se establecieron modelos de ratón de hemofilia B, usando ratones deficientes en FIX (ratones $FIX^{-/-}$), para evaluar la actividad procoagulante de los polipéptidos FIX. Los ratones fueron tratados con polipéptido FIX y se midió la cantidad de sangre perdida en 20 minutos para determinar la actividad procoagulante de los polipéptidos FIX.

A. Evaluación *in vivo* de la actividad procoagulante de FIX tipo silvestre

Se anestesiaron ratones $FIX^{-/-}$ machos mediante administración intraperitoneal de un cóctel de ketamina/xilazina (45 mg/ml y 3.6 mg/ml en solución salina) y se coloca en una plataforma calentada (39°C) para asegurar que no haya caída en la temperatura corporal. La sala de procedimientos se mantuvo a una temperatura de 82°F. Diez minutos antes del corte de la cola, la cola se sumergió en 10 ml de PBS precalentado (tubo de centrífuga de 15 ml; 39°C). Se inyectó de 7 a 15 ratones con FIX humano recombinante (Factor IX de coagulación Benefix® (Recombinante), Wyeth) o polipéptidos FIX modificados diluidos en un tampón que era el mismo que el Factor de coagulación Benefix® IX (Recombinante) (cloruro de sodio al 0.234%, L-histidina 8 mM, 0.8% de sacarosa, 208 mM de glicina, 0.004% de polisorbato 80) a través de la vena de la cola en una sola inyección. Un grupo de ratones de control negativo recibió solo tampón. En los casos en que se omitió la inyección, el animal fue excluido del estudio.

La inyección con polipéptido FIX o tampón se realizó 5 minutos antes del corte de la cola. El corte de la cola se realizó con una cuchilla de afeitar a 5 mm del extremo de la cola y se recogió sangre en PBS durante un período de 20 minutos. Al final del período de recolección, se evaluó la pérdida total de sangre. Los tubos de recolección se mezclaron y se tomó una alícuota de 1 ml de cada muestra y se analizó el contenido de hemoglobina. Triton X-100 se diluyó 1 en 4 en agua estéril y se añadieron 100 μL a las muestras de 1 ml para causar hemólisis. La absorbancia de las muestras se midió luego a una longitud de onda de 546 nm. Para calcular la cantidad de sangre perdida, la absorbancia se leyó contra una curva estándar generada midiendo la absorbancia a 546 nm de volúmenes conocidos de sangre murina, diluida en PBS y hemolizada como anteriormente con Triton X 100. Los valores se expresan como media ± EEM.

1. Estudio de respuesta a la dosis que evalúa la actividad coagulante de FIX tipo silvestre

Se realizaron estudios de respuesta a la dosis para evaluar la actividad coagulante del Factor IX de Coagulación Benefix® (Recombinante) a 0.03, 0.1, 0.3 y 1 mg/kg en ratones $FIX^{-/-}$. En este experimento, la pérdida de sangre en el grupo de solo tampón fue de 835.42 ± 24.55 μl, que se redujo significativamente por el tratamiento con Factor IX de coagulación Benefix® (recombinante) a 0.1, 0.3 y 1 mg/kg (a 558.59 ± 56.63 μl, 415.81 ± 66.72 μl y 270.75 ± 57.48 μl; $p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido de la prueba posterior de Dunn). A la dosis más baja probada de 0.03 mg/kg, el valor fue 731.66 ± 59.16 μl. En la Tabla 28 a continuación se muestran valores ED_{50} calculados mediante regresión no lineal.

2. La respuesta a la dosis que evalúa la actividad coagulante de FIXa-R318Y/R338E/R403E/E410N, FIXa-R318Y/R338E/E410N y FIXa-Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410ND49

Se realizaron estudios de respuesta en el que la actividad coagulante de FIXa-R318Y/R338E/R403E/E410N (R150Y/R170E/R233E/E240N mediante numeración de quimotripsina), FIXa-R318Y/R338E/E410N (R150Y/R170E/E240N mediante numeración de quimotripsina) y FIXa-Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N (Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N mediante numeración de quimotripsina) a diferentes dosis fueron evaluados.

El tratamiento con FIXa-R318Y/R338E/R403E/E410N resultó en una inhibición significativa de la pérdida de sangre a 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 y 1 mg/kg (434.65 ± 73.75 μl, 497.28 ± 50.92 μl, 230.81 ± 39.67 μl, 261.94 ± 58.79 μl y 251.56 ± 41.81 μl, respectivamente) en comparación con el control de solo tampón (811.45 ± 26.63 μl; $p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido de la prueba posterior de Dunn). La reducción de la dosis a 0.003 mg/kg condujo a valores de pérdida de sangre más cercanos a los niveles de control, de 786.83 ± 44.39 μl.

El tratamiento con FIXa-R318Y/R338E/E410N también resultó en una inhibición significativa de la pérdida de sangre a 0.03, 0.1, 0.3 y 1 mg/kg (571.67 ± 50.45 μl, 425.42 ± 43.65 μl, 263.47 ± 42.66 μl y 78.19 ± 13.42 μl, respectivamente) en comparación con el control de solo tampón (845.14 ± 23.63 μl; $p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido de la prueba posterior de Dunn). La reducción de la dosis a 0.001 mg/kg condujo a valores de pérdida de sangre más cercanos a los niveles de control, de 777.16 ± 53.72 μl.

El tratamiento con FIXa-Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N resultó en la inhibición más significativa de la pérdida de sangre de los mutantes probados: 460.03 ± 74.60 μl, 393.48 ± 75.16 μl y 157.28 ± 28.89 μl a 0.01, 0.03 y 0.1 mg/kg, respectivamente, en comparación con el control de solo tampón (851.38 ± 44.25 μl; $p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido de la prueba posterior de Dunn). Valores ED_{50} calculados mediante regresión no lineal se muestran en la Tabla 28 a continuación.

Tabla 28

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo	n (expts)	Pérdida de sangre; DE50 (mg / kg)
BeneFIX Benefix® FIX de Coagulación (T148A)	BeneFIX Benefix® FIX de Coagulación (T [148] A)	7-20	2	0.2
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	19-38	3	0.02
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	8-42	4	0.06
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	18-21	2	0.01

3. Respuesta de duración que evalúa la actividad coagulante de FIX tipo silvestre

Se realizaron estudios para evaluar la duración del efecto del Factor IX de coagulación Benefix® (recombinante) a 0.5 mg/kg en ratones $FIX^{-/-}$. Los ratones se dosificaron por vía intravenosa a las 48 horas, 24 horas, 16 horas, 8 horas, 4 horas, 2 horas, 30 minutos y 5 minutos antes del corte de la cola. En este experimento, la inhibición del grupo de control se determinó donde el grupo de control se estableció en 0% de inhibición. La inhibición de la pérdida de sangre fue 59.7 ± 11.9%, 48.25 ± 12.84%, 57.74 ± 9.10%, 56.04 ± 8.46%, 32.09 ± 7.92%, 12.94 ± 7.33%, 38.75 ± 11.47% y 0.64 ± 11.3% a los 5 min, 30 min, 2, 4, 8, 16, 24 y 48 h, respectivamente, del control del vehículo (media y EEM, n = 8 - 33 ratones, de 3 experimentos).

4. Respuesta de duración que evalúa la actividad coagulante de FIXa-R318Y/R338E/R403E/E410N

Se realizaron estudios para evaluar la duración del efecto de FIXa-R318Y/R338E/R403E/E410N a 0.5 mg/kg en ratones $FIX^{-/-}$. Los ratones se dosificaron iv a las 96 horas, 72 horas, 48 horas, 32 horas, 24 horas, 16 horas, 8 horas, 4 horas, 2 horas, 30 minutos y 5 minutos antes del corte de la cola. En este experimento, la inhibición del grupo de control se determinó donde el grupo de control se estableció en 0% de inhibición. La inhibición de la pérdida de sangre fue 93.26 ± 2.04%, 96.30 ± 3.70%, 85.86 ± 6.52%, 69.4 ± 9.92%, 89.05 ± 3.69%, 78.48 ± 8.71%, 63.33 ± 6.70%, 47.97 ± 10.07%, 3.1 ± 8.22%, -13.52 ± 10.59% y -12.82 ± 7.31% a 5 min, 30 min, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 72 y 96 h, respectivamente, desde el control del vehículo (Media y EEM, n = 8 - 45 ratones, de 4 experimentos).

Nota sobre ratones $FIX^{-/-}$:

La colonia de ratones FIX modificados se generó mediante fertilización de ratones *in* vitro usando esperma crioconservado modificado FIX machos. Todos los descendientes se genotiparon utilizando protocolos basados en PCR para seleccionar aquellos animales que contenían un alelo FIX modificado. Otros cruces de estos animales y sus crías (después del genotipo basado en PCR) produjeron animales FIX modificados (es decir, hemizigotos machos y hembras homocigóticas porque el gen FIX está en el cromosoma X), según lo confirmado por PCR. Después de la confirmación por PCR del genotipo de todos los miembros de esta colonia FIX inicial, la confirmación por PCR de todos los descendientes de la colonia cesó ya que los animales modificados legítimos solo pueden producir descendencia modificada. Sin embargo, los “criadores retirados” de la colonia fueron genotipados en varias ocasiones. Aproximadamente 7 meses después de que el genotipado de todas las crías de la colonia cesó, el genotipado de los criadores retirados indicaba claramente la presencia de animales no eliminados (o de tipo silvestre) en la colonia. En base a este resultado, todos los miembros de la colonia eliminada fueron genotipados y los animales no eliminados fueron identificados y eliminados de la colonia. Los resultados del genotipo de la colonia indicaron que el 19% de los ratones machos eran de tipo silvestre y el 4% de los animales machos eran ambiguos debido a las pobres preparaciones de ADN. Tanto el tipo silvestre como los machos “y las hembras” ambiguas fueron eliminados de la colonia.

Por lo tanto, la colonia modificada FIX estaba contaminada en algún momento con uno o más animales no modificados y, por lo tanto, contenía una pequeña fracción de animales no modificados que aumentó con el tiempo hasta entre el 19 - 23% de los machos en la colonia contenía un gen FIX de tipo silvestre (los experimentos *in vivo* usan solo ratones machos). Con respecto a los datos FIX generados e informados en esta aplicación, todos los datos *in vitro* no se ven afectados. Con respecto a los datos *in vivo*, se supone y se espera que la contaminación afecte a todos los compuestos de manera similar y, por lo tanto, no afecte ni el orden de clasificación de las variantes ni su comparación con BeneFIX. Dado que los animales contaminantes ya tenían FIX endógeno, perderían mucha menos sangre en los experimentos de eficacia y duración que los animales hemofílicos verdaderos y se beneficiarían mucho menos de la administración de FIX exógeno, aumentando así la “propagación” o la variabilidad de los datos para todos los compuestos. La contaminación también podría hacer que todos los compuestos parezcan un poco menos potentes de lo que realmente son, pero su relación con BeneFIX no debería alterarse (es decir, la potencia y la ventaja de duración de nuestras moléculas de plomo no deberían verse afectadas).

B. La evaluación *in vivo* de la actividad FIX procoagulante tipo silvestre – datos de nueva colonia

Los datos descritos a continuación provienen de una nueva colonia, reconstruido a partir de ratones FIX -/- confirmados descritos anteriormente. Los ratones fueron doblemente confirmados por genotipado antes de ser utilizados como reproductores. Todos los datos descritos a continuación provienen de ratones nacidos de unidades de reproducción donde los padres han sido confirmados por duplicado. Todos los reproductores de reemplazo también se confirman dos veces como FIX -/- antes del inicio de nuevas unidades de reproducción.

Ratones $FIX^{-/-}$ fueron anestesiados mediante administración intraperitoneal de un cóctel de ketamina/xilazina (45 mg/ml y 3.6 mg/ml en solución salina) y se coloca en una plataforma caliente (39°C) para asegurar que no hay caída en la temperatura corporal. La sala de procedimientos se mantuvo a una temperatura de 82°F. Diez minutos antes del corte de la cola, la cola se sumergió en 10 ml de PBS precalentado (tubo de centrífuga de 15 ml; 39°C). Se inyectaron de 7 a 15 ratones con FIX humano recombinante (Factor IX de coagulación Benefix® (Recombinante), Wyeth) o polipéptidos FIX modificados diluidos en un tampón que era el mismo que el Factor IX de coagulación Benefix® (Recombinante) (cloruro de sodio al 0.234%, L-histidina 8 mM, 0.8% de sacarosa, 208 mM de glicina, 0.004% de polisorbato 80) a través

de la vena de la cola en una sola inyección. Un grupo de ratones de control negativo recibió solo tampón. En los casos en que se omitió la inyección, el animal fue excluido del estudio.

La inyección con polipéptido FIX o tampón se realizó 5 minutos antes del corte de la cola. El corte de la cola se realizó con una cuchilla de afeitar a 5 mm del extremo de la cola y se recogió sangre en PBS durante un período de 20 minutos. Al final del período de recolección, se evaluó la pérdida total de sangre. Los tubos de recolección se mezclaron y se tomó una alícuota de 1 ml de cada muestra y se analizó el contenido de hemoglobina. Triton X-100 se diluyó 1 en 4 en agua estéril y se añadieron 100 μL a las muestras de 1 ml para causar hemólisis. La absorbancia de las muestras se midió luego a una longitud de onda de 546 nm. Para calcular la cantidad de sangre perdida, la absorbancia se leyó contra una curva estándar generada midiendo la absorbancia a 546 nm de volúmenes conocidos de sangre murina, diluida en PBS y hemolizada como anteriormente con Triton X 100. Los valores se expresan como media ± EEM.

1. Estudios de respuesta a la dosis que evalúan la actividad coagulante FIX

Se realizaron estudios de respuesta a la dosis para evaluar la actividad coagulante del Factor IX de Coagulación Benefix® (recombinante) y los polipéptidos FIX a dosis variables en ratones $FIX^{-/-}$. En estos experimentos se calcularon los valores ED_{50} usando regresión no lineal y se muestran en la Tabla 29 a continuación.

Tabla 29. Valores de dosis de respuesta ED_{50}

Mutación	Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo / expt	N (expts)	ED50 promedio (mg / kg)
BeneFIX	BeneFIX	10-14	2	0.4
WT	Catalyst Biosciences WT	8-15	4	1.6
T148A	T[148]A	10-15	2	1.0
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	10-13	2	0.14
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	13-15	2	0.095
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	7-14	6	0.02
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/A170E/R233E/E240N	9-14	4	0.05
T343R	T175R	9-15	4	0.9
Y155F/K228N/R318Y/R338E /R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	10-14	2	0.08
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	9-18	3	1.0
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	9-14	4	0.06
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	9-15	4	0.03
A103N/N105S/K247N/N249S/	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/	8-10	2	0.08
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N			
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	12-15	2	0.055
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	10-15	2	0.055
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	10-12	1	1.64

Mutación	Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo / expt	N (expts)	ED50 promedio (mg / kg)
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	8-15	5	0.08
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	13-15	2	0.125
Y155F/K228N/ K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	12-15	2	0.035
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	8-14	3	0.03
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	11-15	2	0.04
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	8-15	4	0.26
Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	13-15	3	0.06
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	7-15	5	0.025
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	10-14	2	0.0045
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	10-15	3	0.07
R338E/T343R	R170E/T175R	11-14	2	0.83
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	9-13	3	0.03
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	11-15	2	0.145
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	12-15	3	0.08
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	10-15	2	0.025

Mutación	Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo / expt	N (expts)	ED50 promedio (mg / kg)
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E	10-14	2	0.007
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	11-15	5	0.13
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	10-15	2	0.03
Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E/E240N	13-15	2	0.07
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	11-15	2	0.045
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	10-15	2	0.055
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	11-15	2	0.04
K247N/N249S/ R318Y/R338E/T343 R/R403 E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	11-15	2	0.035
K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10-15	3	0.01
Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	13-15	2	0.04
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	12-15	2	0.03
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	10-15	2	0.02
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E /T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	12-15	3	0.03
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	12-15	1	0.06
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	10-15	2	0.195
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	12-15	3	0.06

Mutación	Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo / expt	N (expts)	ED50 promedio (mg / kg)
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	12-15	1	0.1
Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/ R233E	13-15	2	0.145
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	11-15	2	0.015
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	12-14	2	0.26
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233F,	10-14	2	0.006
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	10-13	2	0.009
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	12-13	1	0.2
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	11-14	1	0.01
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E	13-15	2	0.04
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/ R233E/E240N	10-15	2	0.18
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	12-15	2	0.22
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	12-15	2	0.12
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	11-14	2	0.12
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	10-15	2	0.07
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	14-15	1	0.02
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	11-14	2	0.065
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	12-15	1	0.25

Mutación	Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo / expt	N (expts)	ED50 promedio (mg / kg)
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	10-15	2	0.125
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	13-14	1	0.1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	13-14	2	0.07
Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240N	11-15	1	0.11

2. Respuesta de duración que evalúa la actividad coagulante FIX de tipo silvestre

Se realizaron estudios para evaluar la duración del efecto del Factor IX de coagulación Benefix® (recombinante) a 0.5 mg/kg en ratones $FIX^{-/-}$. Los ratones se dosificaron por vía intravenosa a las 48 horas, 32 horas, 24 horas, 16 horas, 8 horas, 4 horas, 2 horas y 5 minutos antes del corte de la cola. En este experimento, la inhibición del grupo de control se determinó donde el grupo de control se estableció en 0% de inhibición. La inhibición de la pérdida de sangre fue 68.6 ± 5.8%, 64 ± 6.98%, 54.7 ± 6.13%, 43.4 ± 6.86%, 13.7 ± 5.53%, 24.9 ± 6.11%, 11.7 ± 4.88% y 5.6 ± 4.17% a los 5 min, 2, 4, 8, 16, 24, 32 y 48 h, respectivamente, del control del vehículo (media y EEM, n = 10-35 ratones, de 3 experimentos).

3. Respuesta de duración que evalúa la actividad procoagulante del polipéptido FIX

Se realizaron estudios para evaluar la duración del efecto de los polipéptidos FIX a 0.5 mg/kg en ratones $FIX^{-/-}$. Los ratones se dosificaron iv a las 72 horas, 48 horas, 32 horas, 24 horas, 8 horas y 5 minutos antes del corte de la cola, o a las 72 horas, 48 horas y 1 hora antes del corte de la cola. En estos experimentos, la inhibición del grupo de control se determinó donde el grupo de control se estableció en 0% de inhibición. La inhibición de la pérdida de sangre se muestra como % de inhibición (media y EEM) en la Tabla 30.

Tabla 30. Inhibición de la pérdida de sangre.

Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo	N (expt)	Inhibición (% del vehículo (0) +/- EEM) en cada punto de tiempo (horas)						
			0.08	1	8	24	32	48	72
R150Y/R170E/R233E	24-30	2	85+/-3.2		88.8+/-2.8	59.5+/-7.3	71.8+/-7.0	40.2+/-7.8	7.8+/-5.2
R150Y/R170E/E240N	37-44	3	71.6+/-3.9		85.0+/-3.8	59.4+/-6.8	55.3+/-6.1	21.0+/-6.2	27.7+/-7.3
Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	26-29	2		74.2+/-6.5				56.8+/-9.0	15.6+/-8.2
R150Y/R233E/E240N	23-29	2	71.0+/-3.7		71.4+/-6.6	31.1+/-6.1	15.8+/-4.3	4.8+/-5.4	-0.4+/-2.9
R150Y/R170E/R233E/E240N	75-86	7	75.9+/-2		82.7+/-2.6	58+/-4.8	63.6+/-4.4	31.1+/-4.9	3.5+/-2.7
Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	25-30	2		88.5+/-1.7				22.2+/-8.2	-17.6 +/-3.6
D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	35-44	3	70.8+/-3.0		85.5+/-3.5	55.1+/-5.4	48.3+/-7.2	27.3+/-5.7	12.1+/-3.0
T175R	23-28	2	43.7+/-6.3		30.9+/-6.6	23.8+/-3.8	12.3+/-6.1	14.8+/-7.1	3.4+/-3.1
Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	36-43	3	65.2+/-3.0		72.2+/-4.5	59.2+/-6.5	42.4+/-8.3	41.2+/-7.6	4.7+/-5.6
K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	37-41	3	78.7+/-2.5		85.9+/-2.6	52.5+/-5.5	49.9+/-6.8	31.4+/-5.9	5.0+/-4.2

Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo	N (expt)	Inhibición (% del vehículo (0) +/- EEM) en cada punto de tiempo (horas)						
			0.08	1	8	24	32	48	72
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	57-65	5	79.1+/-2.2		79.5+/-2.7	66.7+/-4.0	61.1+/-4.8	38.2+/-5.2	17.1+/-4.0
D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	20-29	2	71.2+/-4.5		74.2+/-6.6	61.2+/-7.2	48.7+/-8.2	54.1+/-7.7	12.3+/-6.5
K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	23-28	2		76.0+/-6.6				26.2+/-8.7	22.3+/-7.1
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	26-30	2		77.7+/-5.1				16.0+/-7.3	-2.2+/-4.3
R150Y/R170E/R233E/E240S	35-42	3	79.3+/-1.9		75.6+/-4.6	51.0+/-5.4	48.3+/-6.5	12.3+/-5.3	-5.6+/-2.4
K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	32-38	3	72.6+/-2.9		78.6+/-3.7	44.2+/-7	53.9+/-7.1	42.9+/-6.9	10.4+/-5.4
D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	26-28	2	81.6+/-3.5		86.0+/-3.6	46.8+/-8.0	59.7+/-7.7	33.8+/-8.3	26.2+/-5.8
Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	23-29	2	85.5+/-2.2		75.6+/-4.0	70.6+/-6.5	58.4+/-6.3	27.0+/-7.7	14.1+/-7.8
R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	40-44	3	69.5+/-3.2		85.5+/-2.6	37.5+/-5.1	42.8+/-6.2	9.0+/-6.6	-3.8+/-3.4
R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	29-38	3	81.3+/-2.5		85.6+/-3.3	45.2+/-6.2	35.6+/-6.3	29.3+/-6.0	3.7+/-3.1
K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E /R233E/E240N	20-28	2	46.4+/		37.7+/-	4.0+/-	16.0+/-	0.08+/-	-6,1+/-

Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo	N (expt)	Inhibición (% del vehículo (0) +/- EEM) en cada punto de tiempo (horas)						
			0.08	1	8	24	32	48	72
			-6.6		7.5	2.6	4.7	3.8	2.4
Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	37-43	3	72.2+/-4.4		69.1+/-5.4	47.0+/-6.1	44.3+/-6.2	27.0+/-6.4	8.1+/-5.3
R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	32-38	3	80.3+/-2.6		78.2+/-3.8	68.3+/-5.5	69.4+/-6.0	23.2+/-7.2	4.9+/-5.8
Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/ R233E/E240N	21-27	2	84.8+/-2.5		87.8+/-2.8	76.6+/-4.2	66.7+/-6.6	56.8+/-8.0	8.2+/-8.0
D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/ T175R/R233E/E240N	26-30	2	80.4+/-2.8		81.5+/-4.8	69.5+/-7.6	60.4+/-7.9	54.8+/-6.7	12.8+/-6.3
R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	35-43	3	76.6+/-3.1		85.1+/-3.3	43.9+/-5.7	47.9+/-6.8	14.9+/-6.2	-12.1 +/-2.9
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	24-30	2	76.2+/-3.0		85.6+/-4.7	49.6+/-6.5	61.1+/-7.4	46.0+/-6.9	0.4+/-4.9
K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	27-29	2		70.0+/-5.8				18.8+/-6.3	2.1+/-2.7
Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	38-44	3	69.8+/-4.7		78.4+/-4.1	56.4+/-5.9	58.4+/-5.8	51.1+/-6.6	26.9+/-5.4
K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	28-30	2		63.9+/-7.2				16.7+/-6.3	-7.0+/-2.0
R150Y/R170E/T175R/R233E	37-43	3	80.0+/-2.1		83.5+/-3.5	62.1+/-5.6	62.6+/-5.3	50.5+/-5.9	1.9+/-4.0

Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo	N (expt)	Inhibición (% del vehículo (0) +/- EEM) en cada punto de tiempo (horas)						
			0.08	1	8	24	32	48	72
Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E	24-28	2	80.4+/-3.0		90.7+/-2.1	65.7+/-6.6	67.2+/-7.3	52.2+/-8.2	41.1+/-8.3
R150Y/R170E/T175R/E240N	35-44	3	65.5+/-4.7		74.1+/-5.3	55.8+/-5.6	53.1+/-6.8	46.4+/-6.7	34.9+/-6.0
R150Y/T175R/R233E/E240N	29-30	2	74.1+/-3.6		77.7+/-3.9	55.3+/-7.5	39.4+/-8.1	24.5+/-7.6	6.8+/-4.8
Y[155]F/R150Y/T175R/R233E/ E240N	25-29	2		92.7+/-2.1				29.3+/-6.1	7.7+/-3.2
R170E/T175R/R233E/E240N	26-30	2	67+/-5.3		87.4+/-4.2	55.9+/-8.7	47.2+/-8.6	33.0+/-8.4	9.2+/-5.3
Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	34-43	3	77.8+/-4.2		90.8+/-2.8	68.6+/-5.2	61.3+/-5.8	35.6+/-8.3	5.9+/-5.0
Y[155]F/K82N/N84S/R50Y/R170E/T175R/R233E/E240N	39-43	3	76.0+/-3.0		80.4+/-3.3	72.7+/-3.8	64.2+/-5.4	51.4+/-5.7	33.1+/-7.3
K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	42-44	3	83.0+/-2.4		81.0+/-2.4	73.8+/-5.2	57.1+/-5.7	48.5+/-6.1	16.9+/-6.8
K63N/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	21-26	2	71.9+/-3.6		85.8+/-4.0	71.3+/-6.8	54.8+/-7.3	40.3+/-10.3	23.1+/-10.4
Y[155]F/K63N/186S/R150Y/R170E/R233E/E240N	26-29	2	82.1+/-2.7		83.6+/-3.7	65.6+/-5.5	57.2+/-7.9	38.4+/-8.9	16.5+/-7.7
N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	24-29	2	75.5+/		76.6+/ -	82.2+/ -	84.7+/ -	41.6+/-	20.1+/-

Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo	N (expt)	Inhibición (% del vehículo (0) +/- EEM) en cada punto de tiempo (horas)						
			0.08	1	8	24	32	48	72
			-4.5		4.3	5.8	3.9	8.6	6.0
Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R1R233E/E240N	21-27	2	85.2+/ -2.5		89.7+/ -3.6	46.5+/ -7.0	63.3+/ -8.0	41.6+/- 8.8	9.1+/- 6.5
K63N/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/R233E/E240N	34-45	3	83.9+/ -1.8		79.8+/ -3.6	75.2+/ -4.9	80.9+/ -3.0	73.0+/- 4.4	43.8+/- 6.6
Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	24-26	2		84.6+/ -3.4				70.6+/- 7.5	50.9 +/- 8.6
Y[155]F/R170E/T175R/R233E	22-30	2	81.9+/ -3.6		79.2+/ -6.2	55.0+/ -8.0	44.4+/ -9.9	26.8+/- 6.8	-6.5+/- 2.7
R170E/T175R/R233E	23-28	2	60.6+/ -6.4		86.5+/ -4.3	35.6+/ -8.3	35.8+/ -8.5	18:9+/- 6.8	12.1+/- 6.0
Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	24-27	2	71.2+/ -4.5		77.8+/ -5.3	54.6+/ -8.2	58.3+/ -8.1	21.9+/- 7.1	-11.0 +/- 3.4
Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	25-29	2	58.2+/ -7.9		65.5+/ -8.3	48.2+/ -10.0	29.3+/ -9.3	21.0+/- 6.7	-14.8 +/- 5.3
Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	23-30	2	84.1+/ -5.1		90.9+/ -2.7	76.6+/ -6.4	62.4+/ -6.7	55.2+/- 7.9	23.7+/- 6.5
R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	27-43	3	80.2+/ -2.5		87.1+/ -3.2	76.9+/ -4.0	67.9+/ -5.6	48.3+/- 5.5	21.0+/- 5.0
Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	12-29	2	70.5+/ -6.9	84.2+/ -5.4	53.2+/ -12.3	39.5+/ -11.1	18.0+/ -7.3	17.0+/- 5.4	-7.4+/- 3.1

Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo	N (expt)	Inhibición (% del vehículo (0) +/- EEM) en cada punto de tiempo (horas)						
			0.08	1	8	24	32	48	72
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	36-41	3	79.6+/ -3.2		90.5+/ -2.4	73.8+/ -4.6	75.0+/ -5.0	74.4+/- 4.7	27.5+/- 6.5
K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	22-28	2	84.3+/ -3.1		91.8+/ -1.4	60.1+/ -6.7	54.0+/ -8.1	43.6+/- 8.8	35.7+/- 8.7
Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	25-30	2		91.1+/ -1.8				22.7+/- 6.6	12.8+/- 6.2
K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	25-28	2		82.7+/ -4.5				67.1+/- 7.7	21.6+/- 8.0
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	20-29	2		83.3+/ -3.9				47.8+/- 7.0	19.4+/- 6.2
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R	24-28	2		43.6+/ -6.5				4.9+/- 4.6	7.2+/- 1.9
Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	15-30	2	47.2+/ -8.0	64.7+/ -9.7	90.8+/ -4.5	78.4+/ -7.5	49.2+/ -11.5	19.7+/- 7.9	-5.8+/- 4.2
Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	25-27	2		70.5+/ -7.0				34.0+/- 7.4	27.9+/- 6.4
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	28-30	2		73.7+/ -6.7				30.1+/- 8.4	43.1+/- 7.9
K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	25-29	2		77.2+/ -6.0				29.5+/- 7.2	29.0+/- 5.5
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	26-28	2		87.6+/				42.6+/-	14.5+/-

Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo	N (expt)	Inhibición (% del vehículo (0) +/- EEM) en cada punto de tiempo (horas)						
			0.08	1	8	24	32	48	72
				-2.4				8.6	6.4
K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	28-30	2		91.3+/-2.6				52.4+/-7.7	6.6+/-4.5
Y[155]F/K82N/N84S/R170E/E240N	25-30	2		74.6+/-6.4				30.1+/-7.1	12.4+/-6.3
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	27-30	2		85.2+/-4.4				31.1+/-7.8	-7.9+/-2.6
K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	25-30	2		51.9+/-8.2				9.4+/-4.9	3.2+/-4.5
Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	27-29	2		84.6+/-5.0				26.8+/-8.5	10.9+/-6.9
K82N/N84 S/R1 70E/T1 75R/R233E	27-29	2		73.0+/-6.6				27.3+/-7.7	23.4+/-5.6
K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	24-29	2		59.1+/-8.0				29.6+/-7.4	12.2+/-5.2
Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	28-30	2		86.5+/-3.9				34.6+/-8.1	-2.3+/-4.0
K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	25-29	2		59.2+/-8.2				1.0+/-4.0	-7.3+/-2.8
Y[155]F/T175R/R233E/E240N	24-28	2		78.7+/-4.9				-5.7+/-2.8	-4.2+/-3.7

Mutación (numeración de quimotripsina)	n / grupo	N (expt)	Inhibición (% del vehículo (0) +/- EEM) en cada punto de tiempo (horas)						
			0.08	1	8	24	32	48	72
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	28-30	2		82.3+/-5.4				64.6+/-7.4	41.4+/-7.7
K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	37-43	3		79.3+/-4.2				47.7+/-5.3	20.9+/-5.5
R170E/T175R/E240N	37-41	3		66.6+/-5.9				31.5+/-6	10.4+/-3.6
R150Y/T175R/E240N	24-28	2		83.5+/-5.1				36.7+/-8.9	20.0+/-6.7
K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	23-29	2		84.5+/-3.1				66.3+/-7.8	41.2+/-8.5
K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	22-28	2		81.9+/-4.1				62.2+/-8.2	28.6+/-8.0

Ejemplo 8.

Determinación de la unión de cofactor funcional ($K_{D\text{-}app}$) de FIXa para su cofactor, factor VIIIa

La unión de cofactor funcional ($K_{D\text{-}app}$) de las variantes de FIXa para el cofactor factor VIIIa (FVIIIa) en la presencia o sustrato de saturación, Factor X (FX), se evaluó indirectamente en un ensayo fluorogénico mediante el ensayo de la actividad de FXa, generada tras la activación por FIXa, en el sustrato sintético Spectrafluor FXa. Se usó un rango de concentraciones de FVIIIa para calcular la constante de velocidad cinética aparente ($K_{D\text{-}app}$) donde el cofactor (FVIIIa) estaba en exceso al menos 1000 veces sobre la concentración de la proteasa activadora (FIXa). El experimento fue diseñado para ser una variación del ensayo descrito en el Ejemplo 4 (Determinación de la actividad catalítica de FIXa para su sustrato, factor X) donde el cofactor (FVIIIa) a diversas concentraciones se preincubó con FIXa en presencia de vesículas de fosfolípidos que se forman el complejo tenasa (Xasa) antes de evaluar la actividad catalítica con niveles saturantes del sustrato, FX. Brevemente, el FIXa titulado en el sitio activo y activado se incubó en un tampón que contiene calcio con vesículas de fosfolípidos mientras que el FVIII recombinante por separado se activa (a FVIIIa) con alfa-trombina. La actividad de la alfa-trombina se extinguió luego mediante la adición de un inhibidor de trombina altamente específico, la hirudina, antes de iniciar el ensayo. Las variantes de FIXa se mezclaron con diversas concentraciones de FVIIIa para formar el complejo Xasa y posteriormente se mezclaron con concentraciones saturantes de FX y el sustrato fluorescente, Spectrafluor FXa (CH_3SO_2-D-CHA-Gly-Arg-AMC) para iniciar el ensayo. La liberación del fluoróforo libre, AMC (7-amino-4-metilcumarina) después de la catálisis de Spectrafluor FXa por FXa se evaluó continuamente durante un período de tiempo, y se determinaron las constantes de velocidad cinética de las variantes de FIXa.

A. Protocolo de ensayo

Para los ensayos que evalúan la velocidad cinética de activación de FX por FIXa en presencia de varias concentraciones de FVIIIa y fosfolípidos, el FVIII recombinante (Kogenate FS®; Bayer healthcare) se resuspendió primero en 1 ml del diluyente proporcionado. La concentración molar de FVIII se determinó luego por absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 1.567 mg^{-1} ml cm^{-1} y un peso molecular de 163.6 kDa. Las variantes FIX se expresaron, purificaron, activaron y valoraron en el sitio activo como se describe en los Ejemplos 1-3 anteriores. Las variantes de FIXa se diluyeron en serie a una concentración de 8 pM (4 ×) en un volumen de 1 ml de 1 × Tampón A (Hepes 20 mM/NaCl 150 mM/$CaCl_2$ 5 mM/0.1% BSA/0.1% PEG-8000, pH 7.4). En preparación para la activación de FVIII a FVIIIa en presencia de fosfolípidos, se diluyeron alfa-trombina (Heamatologic Technologies, Inc.) e hirudina (American Diagnostica) a partir de las concentraciones de existencias del fabricante 1:100 en 1 × Tampón A. FVIII reconstituido fue adicionalmente diluido a una concentración de 1600 nM (4 × de la dosis máxima) en un volumen de 1.6 ml de 1 × Tampón A que contiene fosfolípidos recién resuspendidos 400 μM (fosfatidilcolina (PC) al 75%/fospatidilserina (PS) al 25%); vesículas PS/PC ~120 nm de diámetro; Avanti Polar Lipids). El FVIII se activó a FVIIIa mezclando la solución de FVIII/PC/PS anterior con una concentración final de soluciones de alfa-trombina 15 nM seguidas de 15 minutos de incubación a 25°C. Las reacciones de activación se apagaron posteriormente mediante la adición de hirudina a una concentración final de 150 nM durante 5 minutos a 25°C antes de iniciar una serie de dilución de 1.5 veces en una placa de polipropileno de pozos profundos de 12 canales con un volumen final de 0.5 ml del FVIIIa activado en 1 × Tampón A que contiene 400 μM de vesículas de PC/PS. Las concentraciones finales de FVIIIa (4 ×) fueron 1600 nM, 1066.7 nM, 711.1 nM, 474.1 nM, 316.1 nM, 210.7 nM, 140.5 nM, 93.6 nM, 62.43 nM, 41.6 nM. 27.8 nM y 0 nM para un ensayo de 12 puntos o para un ensayo alternativo de 8 puntos con una serie de dilución de 2 veces; 1600 nM, 600 nM, 400 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM y 0 nM. La serie de diluciones de FVIIIa se mezcló posteriormente 1:1 con las diluciones 4 × FIXa (12.5 μl cada una) en una placa de ensayo negra de media área de 96 pozos de acuerdo con un mapa de placa predefinido (4 variantes/placa de FIXa) y se preincubó 15 min. a 25°C para formar complejos Xasa con concentraciones variadas de FVIIIa. Las soluciones finales 2x (25 μl) fueron las siguientes: variante FIXa 4 pM, FVIIIa 1600 - 0 nM, vesículas PC/PS 200 μM, alfa-trombina 7.5 nM (inhibida) e hirudina 75 nM.

Se preparó una solución de 1000 nM (2x) valorada en el sitio activo y FX tratado con DFP/EGR-cmk (véase el Ejemplo 2, descrito anteriormente) en 20 ml de 1 × Tampón A que contenía sustrato Spectrafluor Xa 1.0 mM proporcionando un volumen suficiente para 4 ensayos. Esto representó una concentración de saturación 2 × de FX que sería al menos 5-20 veces por encima de los valores K_M indicados en el ejemplo 4, Tabla 16. Las reacciones del ensayo se iniciaron típicamente utilizando un sistema de manipulación de líquidos BioMek FX programado para dispensar 25 μl de las diluciones FX/Spectrafluor Xa en 4 placas de ensayo que contienen 25 μl de cada variante FIXa y dilución FVIIIa (complejos Xasa). Las concentraciones finales de los reactivos en el ensayo fueron las siguientes: FIXa 2 pM, FVIIIa 400-0 nM, vesículas PC/PS 100 μM, Spectrafluor Xa 0.5 mM, alfa-trombina 3.8 nM (inhibida), hirudina 38 nM y FX a 500 nM. Las reacciones se monitorizaron en un lector de placa de fluorescencia SpectraMax durante 30 minutos a 37°C. Una curva estándar de AMC libre sirvió como factor de conversión para RFU a μM en los cálculos de análisis de datos posteriores utilizando un rango de dosis que cubría de 0 μM a 100 μM de AMC.

B. Análisis de datos

Para determinar la afinidad funcional de las variantes de FIXa para FVIIIa en función de su actividad catalítica, los datos sin procesar recopilados con la aplicación SoftMax Pro (Molecular Devices) se exportaron como archivos .TXT. Se

realizaron análisis de datos no lineales adicionales directamente dentro del paquete de software ActivityBase utilizando el módulo de análisis de datos XE Runner (software IDBS). Los análisis de datos fueron esencialmente como se describe en el Ejemplo 4B con modificaciones menores. La plantilla Abase se configuró para ajustarse automáticamente a las velocidades de reacción parabólica ($\mu M/s^2$) de las variantes de FIXa probadas en cada concentración de FVIIIa a la función de una hipérbola rectangular estándar (es decir, la ecuación de Michaelis Menten) dada por la ecuación (1) para obtener los valores de ajuste para $V_{máx}$ y $K_{D\text{-}app}$.

Ecuación (1)

$$Velocidad\ de\ Reacción\ (\mu M/s^2) = \frac{V_{máx}[S_0]}{K_{D-app} + [S_0]}$$

La Tabla 31 establece la afinidad funcional ($K_{D\text{-}app}$) para cada una de las variantes de FIXa ensayadas. También se analizaron FIXa de tipo silvestre recombinante (denominado Catalyst Biosciences WT; generado como se describió anteriormente en el Ejemplo 1), FIXa purificado por plasma (Haematologic Technologies, Inc.) y BeneFIX® (Factor de coagulación IX (Recombinante); Wyeth). La Tabla XX presenta los resultados expresados como la constante cinética de afinidad, $K_{D\text{-}app}$ (nM), y también como relación de la afinidad funcional de la FIXa de tipo silvestre en comparación con la de la variante FIXa, en el que la afinidad funcional de cada variante FIXa se define por el valor $K_{D\text{-}app}$ (nM) para la activación del sustrato, FX. Cuando la actividad de la variante FIXa se comparó con la FIXa de tipo silvestre, se comparó con un polipéptido FIXa de tipo silvestre recombinante que se expresó y se purificó usando las mismas condiciones que las utilizadas para las variantes de polipéptidos FIXa para asegurar que cualquier diferencia en la actividad fuera el resultado de la(s) mutación(es), y no el resultado de diferencias en, por ejemplo, modificaciones postraduccionales asociadas con diferentes sistemas de expresión. Por lo tanto, el polipéptido FIXa de tipo silvestre utilizado para la comparación fue el FIXa recombinante de tipo silvestre generado a partir de la clonación del gen FIX establecido en SEQ ID NO: 1 y expresado a partir de células CHOX como un polipéptido con una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3, como se describe en el Ejemplo 1 (es decir, polipéptido Catalyst Biosciences WT FIX). También se proporcionan la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (como porcentaje; %CV) y el número de ensayos realizados (n).

Si bien algunas variantes mostraron afinidades de tipo silvestre o aumentos nominales en $K_{D\text{-}app}$ (por ejemplo, FIXa-R318Y/R338E y FIXa-R318Y/R338E/R403E/E410N), varias variantes mostraron aumentos marcados en la afinidad funcional con más de Incrementos de 6-10 veces en $K_{D\text{-}app}$. Las variantes con combinaciones de las mutaciones R338E, T343R y E410N mostraron las mayores mejoras en la afinidad funcional. Por ejemplo, FIXa- R338E/T343R, FIXa-R318Y/R338E/T343R/E410N, FIXa- R318Y/R338E/E410N, FIXa-Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, FIXa- R338E/E410N y FIXa-K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N se encuentran entre este grupo.

Tabla 31. Afinidad funcional del cofactor de las variantes de FIXa (K_{D-app})

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	K_{D-app} (nM)	±D.E. (nM)	%CV	K_{D-WT}/ K_{D-mut}	n
BeneFIX Benefix® FIX de Coagulación(T148A)	BeneFIX Benefix® FIX de Coagulación(T [148] A)	90.2	13.5	15%	1.1	4
FIXa purificada por plasma	FIXa purificada por plasma	101.6	5.8	6%	0.9	3
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	95.5	4.6	5%	1.0	2
T148A	T[148]A	79.7	27.1	34%	1.2	2
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	305.5	119.5	39%	0.3	2
A262S	A95bS	94.1	18.3	19%	1.0	2
E410N	E240N	74.2	0.6	1%	1.3	2
E239N	E74N	77.3	40.6	53%	1.2	2
T241N/H243S	T76N/H78S	75.5	26.2	35%	1.3	2
S319N/L321S	S151N/L153S	52.4	0.7	1%	1.8	2
R318E	R150E	67.0	5.2	8%	1.4	2
R318Y	R150Y	192.0	55.2	29%	0.5	2
R312Q	RI43Q	45.2	5.6	12%	2.1	2
R312A	R143A	52.9	5.9	11%	1.8	2
R312Y	R143Y	85.2	36.5	43%	1.1	2
R312L	R143L	68.9	15.6	23%	1.4	2
V202Y	V38Y	61.5	3.5	6%	1.6	2
D203Y	D39Y	77.4	11.8	15%	1.2	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{D\text{-}app}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{D\text{-}WT}/K_{D\text{-}mut}$	n
A204M	A40M	60.6	9.0	15%	1.6	2
K400A/R403A	K230A/R233A	129.5	13.4	10%	0.7	2
K400E/R403E	K230E/R233E	298.0	58.0	19%	0.3	2
R403E	R233E	654.0	131.6	20%	0.1	3
K400A	K230A	98.9	7.2	7%	1.0	2
K293A	K126A	86.6	4.0	5%	1.1	2
R338E	R170E	43.0	7.2	17%	2.2	2
R338E/R403E	R170E/R233E	183.0	42.4	23%	0.5	2
R338E/E410N	R170E/E240N	4.1	1.4	33%	23.5	3
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	54.9	3.0	6%	1.7	2
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	340.0	244.7	72%	0.3	2
R403E/E410N	R233E/E240N	910.5	197.3	22%	0.1	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	7.7	4.6	60%	12.4	17
D104N/K106S/R318Y/R338E/ E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	12.4	n.d.	n.d.	7.7	1
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	47.0	12.4	26%	2.0	12
D104N/K106S/Y155F/R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	61.6	n.d.	n.d.	1.6	1
K316N	K148N	66.4	8.3	13%	1.4	2
H257E	H92E	81.3	2.5	3%	1.2	2
E410S	E240S	99.6	2.0	2%	1.0	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{D\text{-}app}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{D\text{-}WT}$/ $K_{D\text{-}mut}$	n
N346D	N178D	126.5	3.5	3%	0.8	2
N346Y	N178Y	65.7	n.d.	n.d.	1.5	1
Y345A	Y177A	29.6	2.3	8%	3.2	2
T343R	T175R	58.4	16.2	28%	1.6	3
T343R/Y345T	T175R/Y177T	68.1	n.d.	n.d.	1.4	1
R318Y/R338E	R150Y/R170E	28.9	n.d.	n.d.	3.3	1
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/YI77T	115.2	n.d.	n.d.	0.8	1
K228N/I1251S S	K63N/I86S	89.7	1.3	1%	1.1	2
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	31.2	4.8	15%	3.1	2
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	62.7	0.6	1%	1.5	2
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	54.7	19.9	36%	1.7	5
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	5.7	1.1	20%	16.7	3
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	12.4	1.1	9%	7.7	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	68.6	17.3	25%	1.4	3
Y155F/K247N[N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	45.8	4.6	10%	2.1	7
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R33	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R	93.1	8.4	9%	1.0	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{D\text{-}app}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{D\text{-}WT}$/ $K_{D\text{-}mut}$	n
8E/R403E/E410N	233E/E240N					
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	87.4	10.3	12%	1.1	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	7.4	n.d.	n.d.	12.8	1
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	53.1	10.4	20%	1.8	3
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	6.8	0.2	3%	14.1	3
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	113.0	0.0	0%	0.8	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	100.5	n.d.	n.d.	0.9	1
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	55.0	n.d.	n.d.	1.7	1
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	8.9	n.d.	n.d.	10.7	1
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	109.7	44.3	40%	0.9	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	147.0	60.8	41%	0.6	2
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	167.0	97.7	58%	0.6	2
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	330.0	319.6	97%	0.3	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	142.0	73.5	52%	0.7	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	65.0	10.8	17%	1.5	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	14.5	4.0	28%	6.6	7

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{D\text{-}app}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{D\text{-}WT}$/ $K_{D\text{-}mut}$	n
R338E/T343R	R170E/T175R	3.4	0.6	18%	28.0	2
T343R/N346Y	T175R/N178Y	38.6	n.d.	n.d.	2.5	1
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/E240N	39.6	n.d.	n.d.	2.4	1
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	15.6	0.1	1%	6.1	2
T343R/N346D	T175R/N178D	78.4	n.d.	n.d.	1.2	1
R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/E240N	76.2	n.d.	n.d.	1.3	1
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	6.1	n.d.	n.d.	15.7	1
Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/E240N	7.4	n.d.	n.d.	12.8	1
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	84.1	17.8	21%	1.1	2
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	29.4	n.d.	n.d.	3.2	1
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	28.5	n.d.	n.d.	3.3	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	15.3	1.3	9%	6.3	3
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	29.1	0.3	1%	3.3	2
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	37.0	5.7	16%	2.6	2
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	72.1	n.d.	n.d.	1.3	1
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	55.0	n.d.	n.d.	1.7	1

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (numeración de quimotripsina)	$K_{D\text{-}app}$ (nM)	±D.E. (nM)	%CV	$K_{D\text{-}WT}$/ $K_{D\text{-}mut}$	n
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	23.2	n.d.	n.d.	4.1	1
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	15.4	n.d.	n.d.	6.2	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	13.9	n.d.	n.d.	6.9	1
Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/E240N	24.9	n.d.	n.d.	3.8	1
K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	14.0	n.d.	n.d.	6.8	1
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	8.4	n.d.	n.d.	11.3	1
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	9.8	n.d.	n.d.	9.7	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	14.0	n.d.	n.d.	6.8	1
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	14.7	n.d.	n.d.	6.5	1
Y155F/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/E240N	8.5	n.d.	n.d.	11.2	1
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	7.5	n.d.	n.d.	12.8	1
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	38.0	n.d.	n.d.	2.5	1
K228N/R150Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	17.5	n.d.	n.d.	5.4	1
K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	7.8	n.d.	n.d.	12.2	1

Ejemplo 9.

Determinación de las actividades de coagulación de variantes de FIX en plasma de hemofilia B

Las actividades de coagulación para variantes de FIX se determinaron mediante un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) en plasma de hemofilia B humana de un solo donante con <1% de actividad de coagulación (George King Bio-Medical, Inc., Overland Park, Kansas) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, el ensayo de aPTT implica la recalcificación del plasma en presencia de una mezcla de fosfolípidos purificados (sustituto de plaquetas) y activadores (caolín y sulfatida). El ensayo aPTT se realizó utilizando el reactivo Dapttin®TC aPTT (Technoclone GmbH, Viena, Austria) esencialmente como se describe en el prospecto del producto del fabricante con variantes FIX añadidas al plasma de hemofilia B a concentraciones finales de 100 nM, 10 nM o 1 nM de variante FIX. Brevemente, las variantes FIX se diluyeron a 1 μM en 1 × Tampón A (Hepes 20 mM/NaCl 150 mM/BSA al 0.5%, pH 7.4) en base a la concentración de zimógeno valorada en el sitio activo (Ejemplo 2). Las variantes de FIX se diluyeron posteriormente en serie a 100 nM, 10 nM y 1 nM directamente en plasma de hemofilia B humana citratada (George King Bio-Medical). Se mezcló un volumen de 100 μl de cada dilución FIX en plasma con 100 μl del reactivo Dapttin®TC aPTT y se incubó a 37°C durante 180 segundos. La coagulación se inició mediante la adición de 100 μl de calcio 25 mM (Diagnostica Stago, Asnières, Francia). El tiempo de coagulación en segundos se midió utilizando un instrumento STArt4 (Diagnostica Stago, Asnières, Francia). Cada experimento representa el promedio de dos mediciones de tiempo de coagulación independientes, que típicamente mostraron <5% CV.

La Tabla 32 expone las actividades de coagulación para cada una de las variantes de FIX ensayadas. También se analizaron FIX recombinante de tipo silvestre (denominado Catalyst Biosciences WT; generado como se describió anteriormente en el Ejemplo 1), y BeneFIX® (Factor de coagulación IX (Recombinante); Wyeth). La Tabla XX presenta los resultados expresados como el tiempo de coagulación en cada una de las tres concentraciones de FIX probadas; 100 nM, 10 nM y 1 nM, en donde cada concentración de FIX representa ~100%, ~10% y ~1% de la concentración normal de FIX en plasma normal agrupado (PNP). Bajo condiciones de ensayo idénticas, el 100% de PNP muestra un tiempo de coagulación de 31.3 ± 2.0 segundos, mientras que los tiempos de coagulación para diluciones de 10% y 1% de PNP en plasma de hemofilia B son 42.7 ± 1.7 y 55.0 ± 4.7 segundos, respectivamente (n=4) . El tiempo de coagulación para el plasma de hemofilia B utilizado en estos análisis se evaluó 83.2 ± 9.2 segundos (n=5). Varias variantes probadas demostraron tiempos de coagulación similares o ligeramente prolongados en comparación con el FIXa de tipo silvestre, donde el polipéptido de FIXa de tipo silvestre utilizado para la comparación fue el FIXa de tipo silvestre recombinante expresado de las células CHOX como un polipéptido con un conjunto de secuencias de aminoácidos adelante en SEQ ID NO: 3, como se describe en el Ejemplo 1 (es decir, polipéptido FIX Catalyst Biosciences WT). Por otro lado, varias variantes mostraron tiempos de coagulación significativamente más cortos. Entre este grupo de variantes están FIXa-R318Y/R338E/T343R, FIXa-R318Y/R338E/E410N, FIXa-R338E/T343R/E410N, FIXa-R318Y/R338E/T343R/E410N, FIXa-K247N/N24/24/33/33 E410N y FIXa-K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N.

Tabla 32. Actividad de coagulación (aPTT) de variantes FIX en plasma de hemofilia B

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (Numeración de Quimotripsina)	aPTT (100 nM) (s)	±D.E.	aPTT (10 nM) (s)	±D.E.	aPTT (1.0 nM) (s)	±D.E.	n
BeneFIX Benefix® Coagulación FIX (T148A)	BeneFIX Benefix® Coagulación FIX (T [148] A)	35.2	n.d.	47.4	n.d.	63.5	n.d.	1
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	35.5	n.d.	46.9	n.d.	60.6	n.d.	1
T148A	T[148]A	33.2	n.d.	43.1	n.d.	59.2	n.d.	1
R338E/R403E	R170E/R233E	34.3	n.d.	46.2	n.d.	58.8	n.d.	1
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	35.6	n.d.	46.6	n.d.	57.1	n.d.	1
Y155F/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/R233E/E240N	31.1	n.d.	41.2	n.d.	52.6	n.d.	1
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	41.7	n.d.	52.7	n.d.	68.4	n.d.	1
Y155F/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E	38.6	n.d.	48.6	n.d.	64.1	n.d.	1
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	21.2	n.d.	24.8	n.d.	34.3	n.d.	1
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	24.5	n.d.	30.8	n.d.	40.0	n.d.	1
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	46.1	n.d.	61.7	n.d.	78.3	n.d.	1
Y155F/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R233E/E240N	42.3	n.d.	57.1	n.d.	74.5	n.d.	1
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	25.4	1.2	33.0	2.1	43.0	1.1	3
T343R	T175R	41.3	2.1	53.3	2.9	67.2	6.2	2
T343R/Y345T	T175R/Y177T	46.8	2.8	56.3	9.6	75.5	1.8	2
R318Y/R338E	R150Y/R170E	26.7	n.d.	31.5	n.d.	45.3	n.d.	1
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	35.6	n.d.	45.1	n.d.	60.1	n.d.	1
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R1	36.0	n.d.	46.8	n.d.	61.8	n.d.	1

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (Numeración de Quimotripsina)	aPTT (100 nM) (s)	±D.E.	aPTT (10 nM) (s)	±D.E.	aPTT (1.0 nM) (s)	±D.E.	n
E/R403E/E 410N	70E/R233E/E240N							
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	28.0	n.d.	30.1	n.d.	40.7	n.d.	1
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/ R150Y/R170E/E240N	25.0	n.d.	31.0	n.d.	43.1	n.d.	1
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	33.7	n.d.	43.8	n.d.	58.4	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	34.1	n.d.	46.2	n.d.	62.4	n.d.	1
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	36.1	n.d.	48.1	n.d.	62.6	n.d.	1
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/ N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	34.8	n.d.	45.6	n.d.	59.3	n.d.	1
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	26.1	n.d.	34.3	n.d.	44.7	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	24.0	n.d.	29.2	n.d.	41.1	n.d.	1
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	26.9	n.d.	34.7	n.d.	47.0	n.d.	1
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	44.4	n.d.	57.2	n.d.	70.2	n.d.	1
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/ K82N/N84S	46.9	n.d.	60.0	n.d.	73.6	n.d.	1
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	35.3	5.1	46.1	8.0	60.6	8.9	2

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (Numeración de Quimotripsina)	aPTT (100 nM) (s)	±D.E.	aPTT (10 nM) (s)	±D.E.	aPTT (1.0 nM) (s)	±D.E.	n
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	38.4	n.d.	50.1	n.d.	67.1	n.d.	1
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	34.9	n.d.	44.7	n.d.	59.1	n.d.	1
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	28.7	n.d.	37.6	n.d.	47.6	n.d.	1
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	30.5	n.d.	40.6	n.d.	52.8	n.d.	1
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	25.5	n.d.	30.7	n.d.	40.3	n.d.	1
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	42.5	n.d.	54.2	n.d.	68.9	n.d.	1
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	37.8	n.d.	48.9	n.d.	65.2	n.d.	1
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	44.7	n.d.	56.9	n.d.	75.7	n.d.	1
Y155F/K247NN249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	49.3	n.d.	59.6	n.d.	75.5	n.d.	1
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	23.7	2.7	29.7	3.3	39.7	6.5	4
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	26.2	3.6	32.0	3.9	42.4	1.8	2
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	27.3	n.d.	34.9	n.d.	48.0	n.d.	1
R338E/T343R	R170E/T175R	27.9	n.d.	33.8	n.d.	45.1	n.d.	1

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (Numeración de Quimotripsina)	aPTT (100 nM) (s)	±D.E.	aPTT (10 nM) (s)	±D.E.	aPTT (1.0 nM) (s)	±D.E.	n
T343R/N346Y	T175R/N178Y	40.8	3.8	54.9	0.8	74.9	2.2	2
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/E240N	28.8	n.d.	41.0	n.d.	54.4	n.d.	1
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	24.5	n.d.	32.5	n.d.	41.7	n.d.	1
T343R/N346D	T175R/N178D	39.9	1.4	51.3	4.8	65.0	4.1	2
R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/E240N	34.8	n.d.	45.1	n.d.	57.9	n.d.	1
R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	41.2	n.d.	47.9	n.d.	61.9	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	40.2	n.d.	51.6	n.d.	62.2	n.d.	1
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	42.0	n.d.	55.6	n.d.	70.3	n.d.	1
K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	44.6	3.0	57.2	4.2	71.5	6.1	3
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	31.0	n.d.	42.1	n.d.	55.6	n.d.	1
K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	32.7	n.d.	42.2	n.d.	56.2	n.d.	1
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	30.1	n.d.	37.9	n.d.	51.4	n.d.	1
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E	32.0	n.d.	41.5	n.d.	53.7	n.d.	1

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (Numeración de Quimotripsina)	aPTT (100 nM) (s)	±D.E.	aPTT (10 nM) (s)	±D.E.	aPTT (1.0 nM) (s)	±D.E.	n
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	24.7	2.9	27.2	2.9	36.5	3.8	5
Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/E240N	25.9	2.1	28.8	3.5	38.5	4.2	2
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	31.7	n.d.	43.3	n.d.	60.7	n.d.	1
Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E/E240N	40.3	n.d.	52.0	n.d.	68.7	n.d.	1
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	25.5	n.d.	30.4	n.d.	41.9	n.d.	1
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	27.5	n.d.	33.3	n.d.	42.3	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	24.2	0.9	29.7	1.4	40.5	2.4	5
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	28.7	n.d.	36.2	n.d.	50.2	n.d.	1
K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	34.5	n.d.	44.9	n.d.	58.2	n.d.	1
Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	34.5	n.d.	46.5	n.d.	60.3	n.d.	1
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	31.4	n.d.	41.1	n.d.	55.4	n.d.	1
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/ E240N	35.3	0.6	45.3	2.5	59.1	3.2	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	28.0	2.0	35.5	3.9	47.7	6.0	8

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (Numeración de Quimotripsina)	aPTT (100 nM) (s)	±D.E.	aPTT (10 nM) (s)	±D.E.	aPTT (1.0 nM) (s)	±D.E.	n
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	30.7	2.3	40.6	2.0	53.5	2.5	2
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	29.8	n.d.	37.9	n.d.	50.1	n.d.	1
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	29.4	n.d.	37.0	n.d.	49.8	n.d.	1
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	28.3	n.d.	33.3	n.d.	44.4	n.d.	1
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	40.5	n.d.	52.9	n.d.	70.1	n.d.	1
Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	31.9	n.d.	40.1	n.d.	54.5	n.d.	1
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	27.4	n.d.	34.0	n.d.	43.3	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	43.2	n.d.	58.6	n.d.	74.2	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/ R233E	32.5	n.d.	41.4	n.d.	55.4	n.d.	1
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/TI75R/R233E	30.8	4.2	39.1	6.9	52.5	9.1	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/ E240N	27.3	n.d.	34.9	n.d.	47.7	n.d.	1
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	28.2	n.d.	35.1	n.d.	47.3	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	29.6	n.d.	37.4	n.d.	48.7	n.d.	1

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (Numeración de Quimotripsina)	aPTT (100 nM) (s)	±D.E.	aPTT (10 nM) (s)	±D.E.	aPTT (1.0 nM) (s)	±D.E.	n
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R	39.6	n.d.	49.7	n.d.	65.0	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E	52.2	n.d.	67.9	n.d.	79.9	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/E240N	32.9	n.d.	43.8	n.d.	55.8	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	39.2	n.d.	50.4	n.d.	62.6	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	27.4	n.d.	31.5	n.d.	41.8	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	28.7	0.4	32.7	0.1	41.8	0.9	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	28.0	0.8	32.7	0.8	42.4	0.3	2
Y155F(K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	38.9	n.d.	50.4	n.d.	65.5	n.d.	1
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	35.9	4.2	46.6	6.0	60.9	7.8	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/E240N	27.1	1.9	31.8	2.0	41.2	0.8	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	44.3	n.d.	60.7	n.d.	75.5	n.d.	1
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	45.3	n.d.	57.5	n.d.	75.7	n.d.	1

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (Numeración de Quimotripsina)	aPTT (100 nM) (s)	±D.E.	aPTT (10 nM) (s)	±D.E.	aPTT (1.0 nM) (s)	±D.E.	n
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/M50Y/T175R/E240N	44.9	0.1	52.5	3.7	64.9	0.5	2
K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	42.7	n.d.	50.2	n.d.	64.6	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	31.1	n.d.	40.9	n.d.	56.2	n.d.	1
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	32.0	n.d.	43.2	n.d.	56.1	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/ R170E/T175R/E240N	28.5	n.d.	32.2	n.d.	45.9	n.d.	1
K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	25.1	3.9	29.9	5.0	41.1	8.0	2
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	36.7	n.d.	49.3	n.d.	65.4	n.d.	1
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	27.4	1.0	31.4	1.7	40.7	0.4	2
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	20.5	n.d.	24.3	n.d.	32.2	n.d.	1
Y155F/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E	43.4	n.d.	56.1	n.d.	71.3	n.d.	1
Y155F/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/T175R/R233E/E240N	36.1	n.d.	47.5	n.d.	63.0	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	28.0	1.4	32.9	0.8	42.6	0.4	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	27.4	1.2	32.7	0.2	42.4	3.1	2
Y155F/K247N/N249S/T343R/E410	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240	36.2	4.5	44.8	5.9	54.4	4.2	5

Mutación (numeración FIX madura)	Mutación (Numeración de Quimotripsina)	aPTT (100 nM) (s)	±D.E.	aPTT (10 nM) (s)	±D.E.	aPTT (1.0 nM) (s)	±D.E.	n
N	N							
Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R233E/E240N	47.2	n.d.	60.7	n.d.	74.2	n.d.	1
Y155F/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/E240N	24.9	4.4	27.5	4.4	34.9	4.4	4
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	19.8	n.d.	23.9	n.d.	34.7	n.d.	1
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	41.3	5.7	49.5	6.0	63.4	6.0	2
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	34.5	n.d.	44.8	n.d.	61.0	n.d.	1
K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	23.4	n.d.	28.8	n.d.	38.9	n.d.	1
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	28.6	n.d.	37.3	n.d.	47.9	n.d.	1
K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	21.4	n.d.	25.8	n.d.	34.3	n.d.	1
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	35.4	n.d.	44.0	n.d.	61.4	n.d.	1

En razón a que serán evidentes modificaciones para los expertos en la técnica, se pretende que esta invención esté limitada solo por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

<110> Catalyst Biosciences, Inc. Madison, Edwin Thanos, Christopher Blouse, Grant Ellsworth

<120> POLIPÉPTIDOS MODIFICADOS DEL FACTOR IX Y SUS USOS

<130> 33328.04918.WO02/4918PC

<140> Aún no asignado
<141> Junto con este

<150> 61/456,298
<151> 2010-11-03

<160> 417

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 1383
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ARNm del Factor IX

<400> 1

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta 60
ggatatctac tcagtgctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt 120
ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaacctt 180
gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaaac 240
actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat 300
ccatgtttaa atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc 360
tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga 420
tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaaggtgg tttgctcctg tactgaggga 480
tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga 540
gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgtttttcc tgatgtggac 600
tatgtaaatt ctactgaagc tgaaaccatt ttggataaca tcactcaaag cacccaatca 660
tttaatgact tcactcgggt tgttggtgga gaagatgcca aaccaggtca attcccttgg 720
caggttgttt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa 780
tggattgtaa ctgctgccca ctgtgttgaa actggtgtta aaattacagt tgtcgcaggt 840
gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt 900
cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ccttctggaa 960
ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa 1020
tacacgaaca tcttcctcaa atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc 1080
cacaaaggga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc 1140
acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat 1200
gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa 1260
gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa 1320
tatggaatat ataccaaggt atcccggtat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc 1380
act 1383

<210> 2
<211> 461
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Factor IX del Precursor

<400> 2

```
Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
 1               5                  10                  15
Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
            20                  25                  30
Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
        35                  40                  45
Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
    50                  55                  60
Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65                  70                  75                  80
Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
                85                  90                  95
Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
            100                 105                 110
Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
        115                 120                 125
Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
    130                 135                 140
Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145                 150                 155                 160
Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
                165                 170                 175
Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
            180                 185                 190
Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
        195                 200                 205
Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
    210                 215                 220
Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
225                 230                 235                 240
Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
                245                 250                 255
Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
            260                 265                 270
Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
        275                 280                 285
His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
    290                 295                 300
Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
305                 310                 315                 320
Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
                325                 330                 335
Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
            340                 345                 350
Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
        355                 360                 365
Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
    370                 375                 380
Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
385                 390                 395                 400
Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
                405                 410                 415
Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
            420                 425                 430
Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
        435                 440                 445
Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
    450                 455                 460
```

<210> 3
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Factor IX maduro

<400> 3

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 4
<211> 461
<212> PRT
<213> Pan troglodytes

<220>
<223> Factor IX de chimpancé

<400> 4

```
Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
 1               5                  10                  15
Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
            20                  25                  30
Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
        35                  40                  45
Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
    50                  55                  60
Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65                  70                  75                  80
Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
                85                  90                  95
Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
            100                 105                 110
Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
        115                 120                 125
Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
    130                 135                 140
Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145                 150                 155                 160
Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
                165                 170                 175
Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
            180                 185                 190
Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
        195                 200                 205
Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
    210                 215                 220
Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
225                 230                 235                 240
Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
                245                 250                 255
Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Asp Thr Gly
            260                 265                 270
Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
        275                 280                 285
His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
    290                 295                 300
Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
305                 310                 315                 320
Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
                325                 330                 335
Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
            340                 345                 350
Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
        355                 360                 365
Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
    370                 375                 380
Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
385                 390                 395                 400
Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
                405                 410                 415
Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
            420                 425                 430
Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
        435                 440                 445
Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
    450                 455                 460
```

<210> 5
<211> 461
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<220>
<223> Factor IX de Rhesus macaque

<400> 5

```
Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
 1               5                  10                  15
Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
            20                  25                  30
Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
        35                  40                  45
Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
    50                  55                  60
Met Glu Glu Lys Cys Asn Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65                  70                  75                  80
Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
                85                  90                  95
Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
            100                 105                 110
Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
        115                 120                 125
Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Lys Gln Phe
    130                 135                 140
Cys Lys Asn Thr Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145                 150                 155                 160
Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Arg Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
                165                 170                 175
Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Thr Leu Thr Arg Ala
            180                 185                 190
Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Glu Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
        195                 200                 205
Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
    210                 215                 220
Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
225                 230                 235                 240
Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
                245                 250                 255
Val Asn Glu Lys Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Asp
            260                 265                 270
Ala Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
        275                 280                 285
His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
    290                 295                 300
Tyr Asn Ala Thr Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
305                 310                 315                 320
Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
                325                 330                 335
Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
            340                 345                 350
Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe Asn Lys Gly Arg Ser Ala Ser Val
        355                 360                 365
Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
    370                 375                 380
Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
385                 390                 395                 400
Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
                405                 410                 415
Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
            420                 425                 430
Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
        435                 440                 445
Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
    450                 455                 460
```

<210> 6
<211> 471
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<223> Factor IX de ratón

<400> 6

```
Met Lys His Leu Asn Thr Val Met Ala Glu Ser Pro Ala Leu Ile Thr
 1               5                  10                  15
Ile Phe Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Thr Glu Cys Ala Val Phe Leu
            20                  25                  30
Asp Arg Glu Asn Ala Thr Lys Ile Leu Thr Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
        35                  40                  45
Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Arg Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
    50                  55                  60
Ile Glu Glu Arg Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65                  70                  75                  80
Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
                85                  90                  95
Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ile Cys Lys Asp Asp Ile
            100                 105                 110
Ser Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Gln Val Gly Phe Glu Gly Arg Asn Cys
        115                 120                 125
Glu Leu Asp Ala Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Lys Gln Phe
    130                 135                 140
Cys Lys Asn Ser Pro Asp Asn Lys Val Ile Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145                 150                 155                 160
Tyr Gln Leu Ala Glu Asp Gln Lys Ser Cys Glu Pro Thr Val Pro Phe
                165                 170                 175
Pro Cys Gly Arg Ala Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Lys Lys Ile Thr Arg
            180                 185                 190
Ala Glu Thr Val Phe Ser Asn Met Asp Tyr Glu Asn Ser Thr Glu Ala
        195                 200                 205
Val Phe Ile Gln Asp Asp Ile Thr Asp Gly Ala Ile Leu Asn Asn Val
    210                 215                 220
Thr Glu Ser Ser Glu Ser Leu Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly
225                 230                 235                 240
Glu Asn Ala Lys Pro Gly Gln Ile Pro Trp Gln Val Ile Leu Asn Gly
                245                 250                 255
Glu Ile Glu Ala Phe Cys Gly Gly Ala Ile Ile Asn Glu Lys Trp Ile
            260                 265                 270
Val Thr Ala Ala His Cys Leu Lys Pro Gly Asp Lys Ile Glu Val Val
        275                 280                 285
Ala Gly Glu Tyr Asn Ile Asp Lys Lys Glu Asp Thr Glu Gln Arg Arg
    290                 295                 300
Asn Val Ile Arg Thr Ile Pro His His Gln Tyr Asn Ala Thr Ile Asn
305                 310                 315                 320
Lys Tyr Ser His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Lys Pro Leu Ile
                325                 330                 335
Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Val Ala Asn Arg Glu Tyr Thr
            340                 345                 350
Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Lys
        355                 360                 365
Val Phe Asn Lys Gly Arg Gln Ala Ser Ile Leu Gln Tyr Leu Arg Val
    370                 375                 380
Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Thr Phe Thr Ile
385                 390                 395                 400
Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Arg Glu Gly Gly Lys Asp Ser
                405                 410                 415
Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr
            420                 425                 430
Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys
        435                 440                 445
Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile
    450                 455                 460
Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
465                 470
```

<210> 7
<211> 282
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<220>
<223> Factor IX de Rata

<400> 7

```
Arg Val Ser Val Ala Tyr Asn Ser Lys Lys Ile Thr Arg Ala Glu Thr
 1               5                  10                  15
Val Phe Ser Asn Thr Asp Tyr Gly Asn Ser Thr Glu Leu Ile Leu Asp
            20                  25                  30
Asp Ile Thr Asn Ser Thr Ile Leu Asp Asn Leu Thr Glu Asn Ser Glu
        35                  40                  45
Pro Ile Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asn Ala Lys Pro
    50                  55                  60
Gly Gln Ile Pro Trp Gln Val Ile Leu Asn Gly Glu Ile Glu Ala Phe
65                  70                  75                  80
Cys Gly Gly Ala Ile Ile Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His
                85                  90                  95
Cys Leu Lys Pro Gly Asp Lys Ile Glu Val Val Ala Gly Glu His Asn
            100                 105                 110
Ile Asp Glu Lys Glu Asp Thr Glu Gln Arg Arg Asn Val Ile Arg Thr
        115                 120                 125
Ile Pro His His Gln Tyr Asn Ala Thr Ile Asn Lys Tyr Ser His Asp
    130                 135                 140
Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Lys Pro Leu Ile Leu Asn Ser Tyr Val
145                 150                 155                 160
Thr Pro Ile Cys Val Ala Asn Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys
                165                 170                 175
Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Lys Val Phe Asn Lys Gly
            180                 185                 190
Arg Gln Ala Ser Ile Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg
        195                 200                 205
Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Ser Ile Tyr Asn Asn Met Phe
    210                 215                 220
Cys Ala Gly Tyr Arg Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Glu Gly Asp Ser
225                 230                 235                 240
Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly
                245                 250                 255
Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile
            260                 265                 270
        Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp
                275                 280
```

<210> 8
<211> 285
<212> PRT
<213> Cavia porcellus

<220>
<223> Factor IX de conejillo de indias

<400> 8

```
Arg Val Ser Ile Pro Ser Val Ser Lys Glu His Asn Arg Ala Asn Ala
 1               5                  10                  15
Ile Phe Ser Arg Met Gly Tyr Val Asn Phe Thr Asp Asp Glu Thr Ile
            20                  25                  30
Trp Asp Asp Asn Asp Asp Asp Glu Thr Ile Trp Asp Asn Ser Thr Glu
        35                  40                  45
Ser Thr Lys Pro Ser Asp Glu Phe Phe Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
    50                  55                  60
Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Asn Gly Glu Thr
65                  70                  75                  80
Glu Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr
                85                  90                  95
Ala Ala His Cys Ile Leu Pro Gly Ile Lys Ile Glu Val Val Ala Gly
            100                 105                 110
Lys His Asn Ile Glu Lys Lys Glu Asp Thr Glu Gln Arg Arg Asn Val
        115                 120                 125
Thr Gln Ile Ile Leu His His Ser Tyr Asn Ala Ser Phe Asn Lys Tyr
    130                 135                 140
Ser His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Lys Pro Leu Ser Leu Asn
145                 150                 155                 160
Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asn Arg Glu Tyr Thr Asn Ile
                165                 170                 175
Phe Leu Lys Phe Gly Ala Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Lys Leu Phe
            180                 185                 190
Ser Gln Gly Arg Thr Ala Ser Ile Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu
        195                 200                 205
Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn
    210                 215                 220
Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln
225                 230                 235                 240
Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Asn Phe
                245                 250                 255
Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys
            260                 265                 270
Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp
        275                 280                 285
```

<210> 9
<211> 409
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<220>
<223> Factor IX de cerdo

<400> 9

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Ser Phe Val Arg Gly Asn Leu Glu
 1               5                  10                  15
Arg Glu Cys Ile Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val
```

```
            20                  25                  30
Phe Glu Asn Thr Glu Lys Thr Asn Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp
        35                  40                  45
Gly Asp Gln Cys Glu Pro Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Leu Cys Lys
    50                  55                  60
Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Gln Val Gly Phe Glu Gly
65                  70                  75                  80
Lys Asn Cys Glu Leu Asp Ala Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys
                85                  90                  95
Lys Gln Phe Cys Lys Thr Gly Ala Asp Ser Lys Val Leu Cys Ser Cys
            100                 105                 110
Thr Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Pro Asp Gln Lys Ser Cys Lys Pro Ala
        115                 120                 125
Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser His Ser Pro Thr Thr
    130                 135                 140
Leu Thr Arg Ala Glu Ile Ile Phe Ser Asn Met Asp Tyr Glu Asn Ser
145                 150                 155                 160
Thr Glu Val Glu Pro Ile Leu Asp Ser Leu Thr Glu Ser Asn Gln Ser
                165                 170                 175
Ser Asp Asp Phe Ile Arg Ile Val Gly Gly Glu Asn Ala Lys Pro Gly
            180                 185                 190
Gln Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Asn Gly Lys Ile Asp Ala Phe Cys
        195                 200                 205
Gly Gly Ser Ile Ile Asn Glu Lys Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys
    210                 215                 220
Ile Glu Pro Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu Tyr Asn Thr
225                 230                 235                 240
Glu Glu Thr Glu Pro Thr Glu Gln Arg Arg Asn Val Ile Arg Ala Ile
                245                 250                 255
Pro His His Ser Tyr Asn Ala Thr Val Asn Lys Tyr Ser His Asp Ile
            260                 265                 270
Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Thr Leu Asn Ser Tyr Val Thr
        275                 280                 285
Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe
    290                 295                 300
Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe Asn Arg Gly Arg
305                 310                 315                 320
Ser Ala Thr Ile Leu Gln Tyr Leu Lys Val Pro Leu Val Asp Arg Ala
                325                 330                 335
Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Val Thr Ile Tyr Ser Asn Met Phe Cys
            340                 345                 350
Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Leu Gly Asp Ser Gly
        355                 360                 365
Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile
    370                 375                 380
Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Val Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr
385                 390                 395                 400
Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp
                405
```

<210> 10
<211> 452
<212> PRT
<213> Canis familiaris

<220>
<223> Factor IX de perro

<400> 10

```
 Met Ala Glu Ala Ser Gly Leu Val Thr Val Cys Leu Leu Gly Tyr Leu
  1               5                  10                  15
 Leu Ser Ala Glu Cys Ala Val Phe Leu Asp Arg Glu Asn Ala Thr Lys
```

```
            20                  25                  30
Ile Leu Ser Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe
        35                  40                  45
Val Arg Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Ile Glu Glu Lys Cys Ser Phe
    50                  55                  60
Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe
65                  70                  75                  80
Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu
                85                  90                  95
Asn Asp Gly Val Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys
            100                 105                 110
Arg Ala Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn
        115                 120                 125
Ile Lys Asn Gly Arg Cys Lys Gln Phe Cys Lys Leu Gly Pro Asp Asn
    130                 135                 140
Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Thr Gly Tyr Gln Leu Ala Glu Asp Gln
145                 150                 155                 160
Arg Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val
                165                 170                 175
Pro His Ile Ser Met Thr Arg Thr Arg Ala Glu Thr Leu Phe Ser Asn
            180                 185                 190
Met Asp Tyr Glu Asn Ser Thr Glu Val Glu Lys Ile Leu Asp Asn Val
        195                 200                 205
Thr Gln Pro Leu Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Lys Asp Ala
    210                 215                 220
Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Asn Gly Lys Val Asp
225                 230                 235                 240
Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Asn Glu Lys Trp Val Val Thr Ala
                245                 250                 255
Ala His Cys Ile Glu Pro Asp Val Lys Ile Thr Ile Val Ala Gly Glu
            260                 265                 270
His Asn Thr Glu Lys Arg Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile
        275                 280                 285
Arg Thr Ile Leu His His Ser Tyr Asn Ala Thr Ile Asn Lys Tyr Asn
    290                 295                 300
His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Thr Leu Asn Ser
305                 310                 315                 320
Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Arg Glu Tyr Ser Asn Ile Phe
                325                 330                 335
Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe Asn
            340                 345                 350
Lys Gly Arg Ser Ala Ser Ile Leu Gln Tyr Leu Lys Val Pro Leu Val
        355                 360                 365
Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn
    370                 375                 380
Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly
385                 390                 395                 400
Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Ile Ser Phe Leu
                405                 410                 415
Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr
            420                 425                 430
Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys
        435                 440                 445
Thr Lys Leu Thr
    450
```

<210> 11
<211> 466
<212> PRT
<213> Felis catus

<220>
<223> Factor IX de gato

<400> 11

```
Met Arg Cys Leu Asn Met Ile Met Ala Glu Pro Pro Gly Leu Ile Thr
 1               5                  10                  15
Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Gly Ala Asp Cys Thr Val Phe Leu
            20                  25                  30
Asp His Glu Asp Ala Thr Lys Val Leu Ser Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
        35                  40                  45
Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
    50                  55                  60
Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65                  70                  75                  80
Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
                85                  90                  95
Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ile Cys Lys Asp Asp Ile
            100                 105                 110
Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Gln Thr Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
        115                 120                 125
Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Lys Gln Phe
    130                 135                 140
Cys Lys Leu Asp Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Thr Gly
145                 150                 155                 160
Tyr Gln Leu Ala Glu Asp Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
                165                 170                 175
Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Pro His Ile Ser Thr Thr His Thr Arg
            180                 185                 190
Ala Glu Thr Leu Phe Leu Asn Met Asp Tyr Glu Asn Ser Thr Thr Asp
        195                 200                 205
Tyr Glu Asn Ser Ala Glu Ala Glu Lys Asn Val Asp Asn Val Thr Gln
    210                 215                 220
Pro Leu Asn Asp Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Lys Thr Ala Lys Pro
225                 230                 235                 240
Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Lys Gly Lys Ile Asp Ala Phe
                245                 250                 255
Cys Gly Gly Ser Ile Ile Asn Glu Lys Trp Val Val Thr Ala Ala His
            260                 265                 270
Cys Ile Asn Pro Asp Val Glu Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn
        275                 280                 285
Thr Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Thr
    290                 295                 300
Ile Leu His His Ser Tyr Asn Ala Ser Val Asn Lys Tyr Ser His Asp
305                 310                 315                 320
Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Thr Leu Asn Ser Tyr Val
                325                 330                 335
Thr Pro Ile Cys Val Ala Asp Arg Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Leu Lys
            340                 345                 350
Phe Gly Tyr Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Lys Val Phe Asn Lys Gly
        355                 360                 365
Arg Pro Ala Thr Ile Leu Gln Tyr Leu Lys Val Pro Leu Val Asp Arg
    370                 375                 380
Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe
385                 390                 395                 400
Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser
                405                 410                 415
Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Ile Asn Phe Leu Thr Gly
            420                 425                 430
Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile
        435                 440                 445
Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys
    450                 455                 460
Leu Thr
465
```

<210> 12
<211> 275
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus

<220>
<223> Factor IX de conejo

<400> 12

```
Gly Val Ser Val Ser His Ala Ser Lys Lys Ile Thr Arg Ala Thr Thr
 1               5                  10                  15
Ile Phe Ser Asn Thr Glu Tyr Glu Asn Phe Thr Glu Ala Glu Thr Ile
            20                  25                  30
Arg Gly Asn Val Thr Gln Arg Ser Gln Ser Ser Asp Asp Phe Thr Arg
        35                  40                  45
Ile Val Gly Gly Glu Asn Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val
    50                  55                  60
Leu Leu Asn Gly Lys Val Glu Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Asn
65                  70                  75                  80
Glu Lys Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Ile Lys Pro Asp Asp Asn
                85                  90                  95
Ile Thr Val Val Ala Gly Glu Tyr Asn Ile Gln Glu Thr Glu Asn Thr
            100                 105                 110
Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro Tyr His Lys Tyr Asn
        115                 120                 125
Ala Thr Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp
    130                 135                 140
Lys Pro Leu Thr Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asn
145                 150                 155                 160
Arg Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Asn Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser
                165                 170                 175
Gly Trp Gly Arg Val Phe Asn Arg Gly Arg Gln Ala Ser Ile Leu Gln
            180                 185                 190
Tyr Leu Arg Val Pro Phe Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr
        195                 200                 205
Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe Asp Val Gly
    210                 215                 220
Gly Lys Asp Ser Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu
225                 230                 235                 240
Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu
                245                 250                 255
Cys Ala Ile Lys Gly Lys Tyr Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Trp Tyr
            260                 265                 270
Val Asn Trp
        275
```

<210> 13
<211> 471
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<220>
<223> Factor IX de pollo

<400> 13

```
Met Ala Lys Ile Pro Leu Ile Leu Ser Phe Cys Leu Leu Glu Ala Phe
 1               5                  10                  15
Leu Gly Ala Glu Ser Thr Val Phe Ile Glu Asn Lys Glu Ala Ser Thr
            20                  25                  30
Val Leu Ser Arg Thr Arg Arg Gly Asn Ser Asn Arg Leu Glu Glu Leu
```

```
        35                  40                  45
Ile Pro Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Ile Glu Glu Lys Cys Ser Phe
    50                  55                  60
Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Lys Thr Met Glu Phe
65                  70                  75                  80
Trp Lys Ile Tyr Ile Asp Gly Asp Gln Cys Asn Ser Asn Pro Cys Lys
                85                  90                  95
Asn Gly Ala Val Cys Lys Asp Gly Val Ser Ser Tyr Glu Cys Met Cys
            100                 105                 110
Pro Pro Gly Tyr Gly Gly Arg Asn Cys Glu Ile Asp Ser Thr Cys Ala
        115                 120                 125
Thr Lys Asn Gly Gly Cys Glu His Phe Cys Arg His Asp Thr Pro Gln
    130                 135                 140
Lys Ala Val Cys Ser Cys Ala Ser Gly Tyr Lys Leu His Glu Asp Gly
145                 150                 155                 160
Lys Ser Cys Lys Pro Ala Val Pro Tyr Pro Cys Gly Arg Ile Thr Ala
                165                 170                 175
Pro Glu Met Arg Gly Lys Val Thr Arg Thr Glu Asn Thr Ile Glu Arg
            180                 185                 190
Trp Asn Ile Thr Ala His Asp Glu Gly Asp Ala His Asp Glu Ala Leu
        195                 200                 205
Asp Ile Thr Glu Pro Pro Pro Pro Pro Thr Thr Ser Ala Ala Pro Ala
    210                 215                 220
Lys Ile Val Pro Ile Thr Lys Asn Asp Thr Arg Val Val Gly Gly Tyr
225                 230                 235                 240
Asp Ser Val Lys Gly Gln Leu Pro Trp Gln Val His Leu Val Asp Ser
                245                 250                 255
Arg Gly Leu Gly Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Asn Glu Lys Trp Val
            260                 265                 270
Val Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Pro Gly Asp Asn Val Thr Ala Val
        275                 280                 285
Ala Gly Glu Tyr Asn Thr Lys Glu Asp Asp His Thr Glu Gln Arg Arg
    290                 295                 300
Gln Val Val Lys Ile Leu Pro Tyr Pro Thr Tyr Asn Arg Thr Arg Asn
305                 310                 315                 320
Lys His His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Gln Pro Leu Thr
                325                 330                 335
Phe Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Gly Ser Arg Asp Phe Thr
            340                 345                 350
Asn Asn Leu Leu Ser Asn Gly Pro Gly Thr Val Ser Gly Trp Gly Ser
        355                 360                 365
Met Leu Tyr Arg Gly Arg Ser Ala Ile Val Leu Gln Val Leu Thr Val
    370                 375                 380
Pro Phe Val Asp Arg Val Thr Cys Leu Lys Ser Thr Ser Thr Thr Ile
385                 390                 395                 400
Leu His Ser Met Phe Cys Ala Gly Tyr Thr Ala Gly Gly Lys Asp Thr
                405                 410                 415
Cys Gly Gly Asp Ser Gly Gly Pro Tyr Thr Asn Ser Ile Gly Glu Thr
            420                 425                 430
Trp Phe Leu Thr Gly Val Thr Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Lys Pro
        435                 440                 445
Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ala Lys Tyr Val Lys Trp Ile
    450                 455                 460
Arg Glu Thr Thr Arg Leu Thr
465                 470
```

<210> 14
<211> 416
<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>
<223> Factor IX de vaca

<400> 14

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Arg Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Lys Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Met Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Gln Ala Gly Phe Glu Gly Thr
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Ala Thr Cys Ser Ile Lys Asn Gly Arg Cys Lys
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Arg Asp Thr Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Asp Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asp Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser His Ile Ser Lys Lys Leu
    130                 135                 140
Thr Arg Ala Glu Thr Ile Phe Ser Asn Thr Asn Tyr Glu Asn Ser Ser
145                 150                 155                 160
Glu Ala Glu Ile Ile Trp Asp Asn Val Thr Gln Ser Asn Gln Ser Phe
                165                 170                 175
Asp Glu Phe Ser Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Glu Arg Gly Gln
            180                 185                 190
Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu His Gly Glu Ile Ala Ala Phe Cys Gly
        195                 200                 205
Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Ile
    210                 215                 220
Lys Pro Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Thr Glu
225                 230                 235                 240
Lys Pro Glu Pro Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ala Ile Pro
                245                 250                 255
Tyr His Ser Tyr Asn Ala Ser Ile Asn Lys Tyr Ser His Asp Ile Ala
            260                 265                 270
Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Glu Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro
        275                 280                 285
Ile Cys Ile Ala Asp Arg Asp Tyr Thr Asn Ile Phe Ser Lys Phe Gly
    290                 295                 300
Tyr Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Lys Val Phe Asn Arg Gly Arg Ser
305                 310                 315                 320
Ala Ser Ile Leu Gln Tyr Leu Lys Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr
                325                 330                 335
Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Ser Ile Tyr Ser His Met Phe Cys Ala
            340                 345                 350
Gly Tyr His Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly
        355                 360                 365
Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile
    370                 375                 380
Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr
385                 390                 395                 400
Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 15
<211> 274
<212> PRT
<213> Ovis aries

<220>
<223> Factor IX de oveja

<400> 15

```
Arg Ala Ser Val Leu His Thr Ser Lys Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr
 1               5                  10                  15
Ile Phe Ser Asn Met Asn Tyr Glu Asn Ser Ser Glu Ala Glu Ile Ile
            20                  25                  30
Trp Asp Asn Val Thr Gln Ser Asn Gln Ser Phe Asp Asp Phe Asn Arg
        35                  40                  45
Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Ala Arg Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val
    50                  55                  60
Leu Leu His Gly Glu Ile Ala Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn
65                  70                  75                  80
Glu Lys Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Ile Lys Pro Gly Val Lys
                85                  90                  95
Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Thr Glu Lys Pro Glu Pro Thr
            100                 105                 110
Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ala Ile Pro Tyr His Gly Tyr Asn
        115                 120                 125
Ala Ser Ile Asn Lys Tyr Ser His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp
    130                 135                 140
Glu Pro Leu Glu Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp
145                 150                 155                 160
Arg Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Tyr Gly Tyr Val Ser
                165                 170                 175
Gly Trp Gly Arg Val Phe Asn Arg Gly Arg Ser Ala Ser Ile Leu Gln
            180                 185                 190
Tyr Leu Lys Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr
        195                 200                 205
Lys Phe Thr Ile Tyr Asn His Met Phe Cys Ala Gly Tyr His Glu Gly
    210                 215                 220
Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu
225                 230                 235                 240
Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu
                245                 250                 255
Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr
            260                 265                 270
Glu Val
```

<210> 16
<211> 463
<212> PRT
<213> Xenopus tropicalis

<220>
<223> Factor IX de rana

<400> 16

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

```
            100                 105                 110
Gln Gln Gly Tyr Ser Gly Lys Asn Cys Glu Leu Glu Leu Pro Val Ile
        115                 120                 125
Cys Ser Ile Met Asn Gly Gly Cys Asp His Met Cys Arg Asp Asp Pro
    130                 135                 140
Val Lys Lys Val Ile Cys Ser Cys Ala Ser Gly Tyr Lys Leu Ala Glu
145                 150                 155                 160
Asn Gly Lys Thr Cys Glu Ala Ala Val Pro Tyr Pro Cys Gly Arg Val
                165                 170                 175
Ser Ser Pro Glu Ala Leu Pro Lys Glu Glu Thr Arg Ser Phe Leu Asp
            180                 185                 190
Ser Leu Glu Gln Asn Leu Thr Ser Ala Ala His Pro Asn Ile Thr Asp
        195                 200                 205
Gln Glu Lys Pro Lys Glu Asp Ile Val Pro Val Thr Val Asp Pro Asn
    210                 215                 220
Val Arg Ile Val Gly Gly Thr Asp Ser Leu Lys Gly Glu Phe Pro Trp
225                 230                 235                 240
Gln Val His Leu Val Asn Lys Asp Asn Leu Gly Phe Cys Ser Gly Ser
                245                 250                 255
Ile Ile Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Phe Leu Ile
            260                 265                 270
Arg Gly Glu Phe Lys Val Val Ala Gly Glu His Asn Thr Glu Val Ser
        275                 280                 285
Asp Gly Thr Glu Gln His His Lys Val Thr Arg Ile Ile Leu Tyr Pro
    290                 295                 300
Ala Tyr Asn Ala Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Asp Ile Ala Leu Leu
305                 310                 315                 320
Glu Leu Glu Lys Pro Leu Glu Leu Asn Asp Tyr Val Arg Pro Val Cys
                325                 330                 335
Ile Gly Asn Met Asp Phe Thr Glu Lys Leu Leu Lys Arg Asn Ala Phe
            340                 345                 350
Ser Met Val Ser Gly Trp Gly Asp Leu Gly Tyr Lys Gly Arg Pro Ala
        355                 360                 365
Val Ile Leu Gln Lys Leu Ala Val Pro Tyr Ile Asn Gln Ala Ala Cys
    370                 375                 380
Lys Lys Ser Ser Arg Phe Ser Ile Tyr Ala Asn Met Phe Cys Ala Gly
385                 390                 395                 400
Tyr Ser Asp Glu Ser Lys Asp Thr Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
                405                 410                 415
His Val Thr Glu Tyr Lys Asn Leu Trp Phe Leu Thr Gly Ile Thr Ser
            420                 425                 430
Trp Gly Glu Lys Cys Ala Glu Lys Asp Lys Tyr Gly Val Tyr Thr Arg
        435                 440                 445
Leu Ser Arg Phe Thr Asp Trp Ile Arg Thr Thr Thr Lys Ile Ser
    450                 455                 460
```

<210> 17
<211> 503
<212> PRT
<213> Danio rerio

<220>
<223> Factor IX de pez cebra

<400> 17

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

```
    50                  55                  60
Ala Arg Glu Ala Phe Glu Asn Asp Glu Lys Thr Met Glu Phe Trp Ala
65                  70                  75                  80
Ser Tyr Val Asp Gly Asn Gln Cys Lys Pro Ser Pro Cys Gln Asn Gln
                85                  90                  95
Gly Thr Cys Glu Asp Gln Met Gly Thr Tyr Ser Cys Asn Cys Leu Ala
            100                 105                 110
Arg Phe Cys Trp Gln Asn Cys Glu Ile Val Thr Ala Lys Lys Cys Asp
        115                 120                 125
Val Asp Asn Gly Gly Cys Glu His Phe Cys Val Leu Leu Glu Ser His
    130                 135                 140
Lys Thr Gln Cys Arg Val His Met Asp Thr Asn Ser Gln Lys Met Asp
145                 150                 155                 160
Phe Thr Cys Glu Pro Ile Val Lys Phe Pro Cys Gly Lys Thr Ser Lys
                165                 170                 175
Pro Ala Val Lys Thr Phe Gly Thr Ala Ser Val Thr Asn Thr Thr Ala
            180                 185                 190
Gln Ser Ser Asn Lys Thr Ile Lys Ser Thr Ser Ser Ile Pro Lys Pro
        195                 200                 205
Asp Asn Leu Thr Asn Pro Thr Asn Ser Lys Asp Ile Lys Glu Lys Leu
    210                 215                 220
Ala Pro Pro Arg Ala Lys Leu Pro Lys Trp Ala Phe Glu Glu Tyr Leu
225                 230                 235                 240
Thr Ser Pro Ala Pro Thr Val Ser Gly Leu Lys Ser Arg Ile Ile Gly
                245                 250                 255
Gly Asn Ser Ala Leu Pro Gly Glu Ile Pro Trp Gln Val Ala Leu Val
            260                 265                 270
Ser Arg Ser Thr Gln Gln Val Phe Cys Gly Gly Ser Ile Leu Asn Pro
        275                 280                 285
Leu Trp Val Ile Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Gly Asn His Asn Gly
    290                 295                 300
Ser Phe Tyr Ile Arg Val Gly Glu His Asp Val Ser Lys Ile Glu Gly
305                 310                 315                 320
Thr Glu Gln Asn Val Asp Val Ile Lys Leu Ile Ser His Pro Arg Tyr
                325                 330                 335
Asn Ser Lys Val Ser Leu Phe Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu
            340                 345                 350
Arg Ser Pro Ile Arg Leu Thr Pro Thr Val Arg Pro Ile Cys Leu Gly
        355                 360                 365
Pro Met Val Phe Ser Asn Thr Leu Leu Gln Ser Gly Thr Leu Ala Thr
    370                 375                 380
Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Arg Phe Gln Gly Arg Ser Ala Ala Thr
385                 390                 395                 400
Leu Gln Lys Ile Glu Leu Pro Tyr Val Asp Arg Thr Val Cys Lys Glu
                405                 410                 415
Ser Ser Ser Asp Pro Ile Thr His Phe Met Phe Cys Ala Gly His Ser
            420                 425                 430
Asp Ser Pro Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
        435                 440                 445
Met Arg Tyr His Asn Thr Trp Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
    450                 455                 460
Glu Glu Cys Ala Lys Lys Gly Lys Tyr Gly Val Tyr Thr Gln Val Gly
465                 470                 475                 480
Asn Tyr Tyr Arg Trp Ile Gln His Thr Met Gly Val Thr Thr Gly Ala
                485                 490                 495
Leu Leu Thr Asn Val Asp Gln
            500
```

<210> 18
<211> 537
<212> PRT
<213> Takifugu rubripes

<220>
<223> Factor IX de pez globo japonés

<400> 18

```
Met Ala Arg Asp Phe Leu Leu Ala Leu Ile Ala Ala Leu Leu Leu Glu
 1               5                  10                  15
Val Ser Gly Leu Pro Thr Glu Gly Ser Thr Gly Gly Val Phe Val Ser
            20                  25                  30
Pro Gln Ala Ala Asn Met Val Leu Leu Arg Gln Arg Arg Tyr Asn Ser
        35                  40                  45
Gly His Leu Glu Glu Leu Gln Lys Asp Asn Leu Glu Arg Glu Cys Lys
    50                  55                  60
Glu Glu Gln Cys Thr Met Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Asp
65                  70                  75                  80
Glu Lys Thr Ala Glu Phe Trp Val Gly Tyr Ile Asp Gly Asp Gln Cys
                85                  90                  95
Val Pro Pro Pro Cys Gln Asn Glu Gly Val Cys Lys Asp Gly Ile Asn
            100                 105                 110
Ser Tyr Val Cys Trp Cys Lys Pro Asp Phe Ser Gly Arg Asn Cys Glu
        115                 120                 125
Ile Glu Val Ser Lys Gln Cys Ser Val Asn Asn Gly Gly Cys Ser His
    130                 135                 140
Phe Cys Val Met Gln Gly Asp Ile Ser Val Cys His Cys Ala Val Gly
145                 150                 155                 160
His Arg Leu Gly Leu Asp Lys Lys Ser Cys Glu Pro Thr Asp Gln Phe
                165                 170                 175
Ser Cys Gly His Ile Asn Met Ser Phe Ser Ser Lys Ser Asn Val Gln
            180                 185                 190
Arg Arg Ser Leu Met Gln Lys Leu Glu Ala Asn Arg Thr Phe Ser Ser
        195                 200                 205
Ile Leu Leu Gly Asp Tyr Ser Asp Asn Ser Thr Glu Leu Tyr Asp Tyr
    210                 215                 220
Ile Glu Ser Met Asp Trp Ala Pro Pro Asn Thr Thr Met Ile Asp Pro
225                 230                 235                 240
Arg Ser Gly Arg Thr Ser Ser Val Gly Pro Asp Gln Asn Arg Ser Ser
                245                 250                 255
Leu Thr Glu Asp Leu Ile Ser Val Ser Glu Thr Glu Ile Pro Tyr Trp
            260                 265                 270
Ala Phe Pro Thr Leu Pro Thr Ile Pro Glu Lys Glu Asn Thr Asp Gln
        275                 280                 285
Arg Ile Val Gly Gly Asp Glu Ala Leu Pro Gly Glu Ile Pro Trp Gln
    290                 295                 300
Val Thr Leu Met Ser His Ser Val Ile Leu Gln Arg Ala Glu Pro Phe
305                 310                 315                 320
Cys Gly Gly Ser Leu Phe Ser Asp Leu Trp Val Ile Thr Ala Ala His
                325                 330                 335
Cys Leu Ile Asn Glu Lys Ile Ala Lys Gln Gly Ile Leu His Ser Ser
            340                 345                 350
Arg Glu His Asp Val Ser Lys Asp Glu Gly Pro Glu Arg Asp His Thr
        355                 360                 365
Val Ala Glu Gln His Ile His Phe Met Tyr Asp Tyr Lys Lys Ser Pro
    370                 375                 380
Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Asn Lys Pro Val Glu Leu
385                 390                 395                 400
Ser Asn Lys Arg Arg Pro Ile Cys Leu Gly Pro Lys Asp Phe Thr Glu
                405                 410                 415
Thr Leu Leu Arg Glu Ser Thr Ser Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Arg
            420                 425                 430
Ile Lys Phe Phe Gly Leu Glu Ala Thr Lys Leu Gln Lys Leu Glu Val
        435                 440                 445
Pro Tyr Val Asp Arg Thr Arg Cys Lys Gln Ser Ser Arg Glu Gln Val
    450                 455                 460
Thr Arg Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Gln Leu Gln Ala Lys Asp Ser
465                 470                 475                 480
Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr Lys Tyr Lys Asp Thr
                485                 490                 495
Trp Phe Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Lys Asp
            500                 505                 510
Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Arg Val Ser Arg Tyr Tyr Pro Trp Ile
        515                 520                 525
Ser Gln Lys Thr Gly Leu Gln Met Ser
    530                 535
```

<210> 19
<211> 245
<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>
<223> Mature chymotrypsin

<400> 19

```
Cys Gly Val Pro Ala Ile Gln Pro Val Leu Ser Gly Leu Ser Arg Ile
 1               5                  10                  15
Val Asn Gly Glu Glu 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 Asn
        35                  40                  45
Glu Asn Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Gly Val Thr Thr Ser Asp
    50                  55                  60
Val Val Val Ala Gly Glu Phe Asp Gln Gly Ser Ser Ser Glu Lys Ile
65                  70                  75                  80
Gln Lys Leu Lys Ile Ala Lys Val Phe Lys Asn Ser Lys Tyr Asn Ser
                85                  90                  95
Leu Thr Ile Asn Asn Asp Ile Thr Leu Leu Lys Leu Ser Thr Ala Ala
            100                 105                 110
Ser Phe Ser Gln Thr Val Ser Ala Val Cys Leu Pro Ser Ala Ser Asp
        115                 120                 125
Asp Phe Ala Ala Gly Thr Thr Cys Val Thr Thr Gly Trp Gly Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Tyr Thr Asn Ala Asn Thr Pro Asp Arg Leu Gln Gln Ala Ser Leu
145                 150                 155                 160
Pro Leu Leu Ser Asn Thr Asn Cys Lys Lys Tyr Trp Gly Thr Lys Ile
                165                 170                 175
Lys Asp Ala 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 Lys Lys Asn Gly Ala Trp Thr
        195                 200                 205
Leu Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Ser Thr Cys Ser Thr Ser Thr
    210                 215                 220
Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Thr Ala Leu Val Asn Trp Val Gln Gln
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ala Ala Asn
                245
```

<210> 20
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> BeneFIX, Factor IX recombinante

<400> 20

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 21
<211> 464
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Antitrombina III

<400> 21

```
Met Tyr Ser Asn Val Ile Gly Thr Val Thr Ser Gly Lys Arg Lys Val
 1               5                  10                  15
Tyr Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ile Gly Phe Trp Asp Cys Val Thr Cys
            20                  25                  30
His Gly Ser Pro Val Asp Ile Cys Thr Ala Lys Pro Arg Asp Ile Pro
        35                  40                  45
Met Asn Pro Met Cys Ile Tyr Arg Ser Pro Glu Lys Lys Ala Thr Glu
    50                  55                  60
Asp Glu Gly Ser Glu Gln Lys Ile Pro Glu Ala Thr Asn Arg Arg Val
65                  70                  75                  80
Trp Glu Leu Ser Lys Ala Asn Ser Arg Phe Ala Thr Thr Phe Tyr Gln
                85                  90                  95
His Leu Ala Asp Ser Lys Asn Asp Asn Asp Asn Ile Phe Leu Ser Pro
            100                 105                 110
Leu Ser Ile Ser Thr Ala Phe Ala Met Thr Lys Leu Gly Ala Cys Asn
        115                 120                 125
Asp Thr Leu Gln Gln Leu Met Glu Val Phe Lys Phe Asp Thr Ile Ser
    130                 135                 140
Glu Lys Thr Ser Asp Gln Ile His Phe Phe Phe Ala Lys Leu Asn Cys
145                 150                 155                 160
Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Asn Lys Ser Ser Lys Leu Val Ser Ala Asn
                165                 170                 175
Arg Leu Phe Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Asn Glu Thr Tyr Gln Asp
            180                 185                 190
Ile Ser Glu Leu Val Tyr Gly Ala Lys Leu Gln Pro Leu Asp Phe Lys
        195                 200                 205
Glu Asn Ala Glu Gln Ser Arg Ala Ala Ile Asn Lys Trp Val Ser Asn
    210                 215                 220
Lys Thr Glu Gly Arg Ile Thr Asp Val Ile Pro Ser Glu Ala Ile Asn
225                 230                 235                 240
Glu Leu Thr Val Leu Val Leu Val Asn Thr Ile Tyr Phe Lys Gly Leu
                245                 250                 255
Trp Lys Ser Lys Phe Ser Pro Glu Asn Thr Arg Lys Glu Leu Phe Tyr
            260                 265                 270
Lys Ala Asp Gly Glu Ser Cys Ser Ala Ser Met Met Tyr Gln Glu Gly
        275                 280                 285
Lys Phe Arg Tyr Arg Arg Val Ala Glu Gly Thr Gln Val Leu Glu Leu
    290                 295                 300
Pro Phe Lys Gly Asp Asp Ile Thr Met Val Leu Ile Leu Pro Lys Pro
305                 310                 315                 320
Glu Lys Ser Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Leu Thr Pro Glu Val Leu
                325                 330                 335
Gln Glu Trp Leu Asp Glu Leu Glu Glu Met Met Leu Val Val His Met
            340                 345                 350
Pro Arg Phe Arg Ile Glu Asp Gly Phe Ser Leu Lys Glu Gln Leu Gln
        355                 360                 365
Asp Met Gly Leu Val Asp Leu Phe Ser Pro Glu Lys Ser Lys Leu Pro
    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> 22
<211> 432
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Antitrombina III Escindida (33-464)

<400> 22

```
His Gly Ser Pro Val Asp Ile Cys Thr Ala Lys Pro Arg Asp Ile Pro
 1               5                  10                  15
Met Asn Pro Met Cys Ile Tyr Arg Ser Pro Glu Lys Lys Ala Thr Glu
            20                  25                  30
Asp Glu Gly Ser Glu Gln Lys Ile Pro Glu Ala Thr Asn Arg Arg Val
        35                  40                  45
Trp Glu Leu Ser Lys Ala Asn Ser Arg Phe Ala Thr Thr Phe Tyr Gln
    50                  55                  60
His Leu Ala Asp Ser Lys Asn Asp Asn Asp Asn Ile Phe Leu Ser Pro
65                  70                  75                  80
Leu Ser Ile Ser Thr Ala Phe Ala Met Thr Lys Leu Gly Ala Cys Asn
                85                  90                  95
Asp Thr Leu Gln Gln Leu Met Glu Val Phe Lys Phe Asp Thr Ile Ser
            100                 105                 110
Glu Lys Thr Ser Asp Gln Ile His Phe Phe Phe Ala Lys Leu Asn Cys
        115                 120                 125
Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Asn Lys Ser Ser Lys Leu Val Ser Ala Asn
    130                 135                 140
Arg Leu Phe Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Asn Glu Thr Tyr Gln Asp
145                 150                 155                 160
Ile Ser Glu Leu Val Tyr Gly Ala Lys Leu Gln Pro Leu Asp Phe Lys
                165                 170                 175
Glu Asn Ala Glu Gln Ser Arg Ala Ala Ile Asn Lys Trp Val Ser Asn
            180                 185                 190
Lys Thr Glu Gly Arg Ile Thr Asp Val Ile Pro Ser Glu Ala Ile Asn
        195                 200                 205
Glu Leu Thr Val Leu Val Leu Val Asn Thr Ile Tyr Phe Lys Gly Leu
    210                 215                 220
Trp Lys Ser Lys Phe Ser Pro Glu Asn Thr Arg Lys Glu Leu Phe Tyr
225                 230                 235                 240
Lys Ala Asp Gly Glu Ser Cys Ser Ala Ser Met Met Tyr Gln Glu Gly
                245                 250                 255
Lys Phe Arg Tyr Arg Arg Val Ala Glu Gly Thr Gln Val Leu Glu Leu
            260                 265                 270
Pro Phe Lys Gly Asp Asp Ile Thr Met Val Leu Ile Leu Pro Lys Pro
        275                 280                 285
Glu Lys Ser Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Leu Thr Pro Glu Val Leu
    290                 295                 300
Gln Glu Trp Leu Asp Glu Leu Glu Glu Met Met Leu Val Val His Met
305                 310                 315                 320
Pro Arg Phe Arg Ile Glu Asp Gly Phe Ser Leu Lys Glu Gln Leu Gln
                325                 330                 335
Asp Met Gly Leu Val Asp Leu Phe Ser Pro Glu Lys Ser Lys Leu Pro
            340                 345                 350
Gly Ile Val Ala Glu Gly Arg Asp Asp Leu Tyr Val Ser Asp Ala Phe
        355                 360                 365
His Lys Ala Phe Leu Glu Val Asn Glu Glu Gly Ser Glu Ala Ala Ala
    370                 375                 380
Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg Ser Leu Asn Pro Asn Arg Val
385                 390                 395                 400
Thr Phe Lys Ala Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile Arg Glu Val Pro
                405                 410                 415
Leu Asn Thr Ile Ile Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro Cys Val Lys
            420                 425                 430
```

<210> 23
<211> 4194
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Vector pFUSE-hIgGl-Fc2

<400> 23

ggatctgcga tcgctccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg 60
agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa cgggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa 120
actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gccttttcc cgagggtggg ggagaaccgt 180
atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac 240
agctgaagct tcgaggggct cgcatctctc cttcacgcgc ccgccgccct acctgaggcc 300
gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc cgcctcccgc ctgtggtgcc tcctgaactg 360
cgtccgccgt ctaggtaagt ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc 420
cttggagcct acctagactc agccggctct ccacgctttg cctgaccctg cttgctcaac 480
tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc gccgttacag atccaagctg tgaccggcgc 540
ctacctgaga tcaccggcga aggagggcca ccatgtacag gatgcaactc ctgtcttgca 600
ttgcactaag tcttgcactt gtcacgaatt cgatatcggc catggttaga tctgacaaaa 660
ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct 720
tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg 780
tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg 840
aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg 900
tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg 960
tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc 1020
cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc aagaaccagg 1080
tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga 1140
gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct 1200
ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct 1260
tctcatgctc cgtgatgcac gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc 1320
tgtctccggg taaatgagtg ctagctggcc agacatgata agatacattg atgagtttgg 1380
acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat 1440
tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca 1500
ttttatgttt caggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt taaagcaagt aaaacctcta 1560
caaatgtggt atggaattaa ttctaaaata cagcatagca aaactttaac ctccaaatca 1620
agcctctact tgaatccttt tctgagggat gaataaggca taggcatcag gggctgttgc 1680
caatgtgcat tagctgtttg cagcctcacc ttctttcatg gagtttaaga tatagtgtat 1740
tttcccaagg tttgaactag ctcttcattt ctttatgttt taaatgcact gacctcccac 1800
attccctttt tagtaaaata ttcagaaata atttaaatac atcattgcaa tgaaaataaa 1860
tgtttttttat taggcagaat ccagatgctc aaggcccttc ataatatccc ccagtttagt 1920
agttggactt agggaacaaa ggaaccttta atagaaattg gacagcaaga aagcgagctt 1980
ctagcttatc ctcagtcctg ctcctctgcc acaaagtgca cgcagttgcc ggccgggtcg 2040
cgcagggcga actcccgccc ccacggctgc tcgccgatct cggtcatggc cggcccggag 2100
gcgtcccgga agttcgtgga cacgacctcc gaccactcgg cgtacagctc gtccaggccg 2160
cgcacccaca cccaggccag ggtgttgtcc ggcaccacct ggtcctggac cgcgctgatg 2220
aacagggtca cgtcgtcccg gaccacaccg gcgaagtcgt cctccacgaa gtcccgggag 2280
aacccgagcc ggtcggtcca gaactcgacc gctccggcga cgtcgcgcgc ggtgagcacc 2340
ggaacggcac tggtcaactt ggccatgatg gctcctcctg tcaggagagg aaagagaaga 2400
aggttagtac aattgctata gtgagttgta ttatactatg cagatatact atgccaatga 2460
ttaattgtca aactagggct gcagggttca tagtgccact tttcctgcac tgccccatct 2520
cctgcccacc ctttcccagg catagacagt cagtgactta ccaaactcac aggagggaga 2580
aggcagaagc ttgagacaga cccgcgggac cgccgaactg cgaggggacg tggctagggc 2640
ggcttctttt atggtgcgcc ggccctcgga ggcagggcgc tcggggaggc ctagcggcca 2700
atctgcggtg gcaggaggcg gggccgaagg ccgtgcctga ccaatccgga gcacatagga 2760
gtctcagccc cccgccccaa agcaagggga agtcacgcgc ctgtagcgcc agcgtgttgt 2820
gaaatggggg cttgggggggg ttggggccct gactagtcaa aacaaactcc cattgacgtc 2880
aatggggtgg agacttggaa atccccgtga gtcaaaccgc tatccacgcc cattgatgta 2940
ctgccaaaac cgcatcatca tggtaatagc gatgactaat acgtagatgt actgccaagt 3000
aggaaagtcc cataaggtca tgtactgggc ataatgccag gcgggccatt taccgtcatt 3060
gacgtcaata gggggcgtac ttggcatatg atacacttga tgtactgcca agtgggcagt 3120
ttaccgtaaa tactccaccc attgacgtca atggaaagtc cctattggcg ttactatggg 3180
aacatacgtc attattgacg tcaatgggcg ggggtcgttg ggcggtcagc caggcgggcc 3240
atttaccgta agttatgtaa cgcctgcagg ttaattaaga acatgtgagc aaaaggccag 3300
caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc 3360
cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta 3420
taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg 3480
ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc 3540
tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac 3600
gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac 3660
ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 3720
aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga 3780
agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt 3840
agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag 3900
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct 3960
gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatggctag ttaattaaca 4020
tttaaatcag cggccgcaat aaaatatctt tattttcatt acatctgtgt gttggttttt 4080
tgtgtgaatc gtaactaaca tacgctctcc atcaaaacaa aacgaaacaa aacaaactag 4140
caaaataggc tgtccccagt gcaagtgcag gtgccagaac atttctctat cgaa 4194

<210> 24

<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo pFUSE-Acc-F1

<400> 24
gtgctagctg gccagacatg ataag 25

<210> 25
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso de pFUSE-Acc-R3

<400> 25
catggtggcc ctccttcgcc ggtgatc 27

<210> 26
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo de Factor IX-wtsp-Invivo-F1

<400> 26
cgaaggaggg ccaccatgca gcgcgtgaac atgatc 36

<210> 27
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso de Factor IX-Invivo-R1

<400> 27
tgtctggcca gctagcactt aagtgagctt tgtttttcc 40

<210> 28
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-A[103]N/N[105]S-For

<400> 28
gtaaaaatag taatgatagc aaggtggttt g 31

<210> 29
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-D[104]N/K[106]S-For

<400> 29
gtaaaaatag tgctaataac agtgtggttt gctcctgtac tg 42

<210> 30
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K[106]N/V[108]S-For

<400> 30
gtgctgataa caatgtgagt tgctcctgta ctg 33

<210> 31
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-D[85]N-For

<400> 31
gaactgtgaa ttaaatgtaa catgtaac 28

<210> 32
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-T[148]A-For

<400> 32
ctcacccgtg ctgaggctgt ttttcctgat gtg 33

<210> 33
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-D39N/F41T-For

<400> 33
gaatggtaaa gttaatgcaa cctgtggagg ctctatc 37

<210> 34
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K63N-For

<400> 34
gaaactggtg ttaacattac agttgtcgc 29

<210> 35

<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-I86S-For

<400> 35
gcgaaatgtg agtcgaatta ttcctc 26

<210> 36
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-A95bS-For

<400> 36
caactacaat gcaagtatta ataagtacaa c 31

<210> 37
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K243N-For

<400> 37
aaggaaaaaa caaatctcac ttaagtgcta gctg 34

<210> 38
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-E240N-For

<400> 38
ctggattaag aataaaacaa agctc 25

<210> 39
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-E74N-For

<400> 39
caggtgaaca taatattaac gagacagaac atacag 36

<210> 40
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-T76N/H78S-For

<400> 40
gaacataata ttgaggagaa cgaaagtaca gagcaaaag 39

<210> 41
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K82N/N84S-For

<400> 41
cagaacatac agagcaaaat cgatctgtga ttcgaattat tc 42

<210> 42
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-L153N-For

<400> 42
gggagatcag ctaatgttct tcagtac 27

<210> 43
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-F145N/H147S-For

<400> 43
ctggggaaga gtcaactcca aagggagatc ag 32

<210> 44
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K222N/K224S-For

<400> 44
gagtgtgcaa tgaacggctc atatggaata tatac 35

<210> 45
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-S151N/L153S-For

<400> 45
cttccacaaa gggagaaatg cttcagttct tca 33

<210> 46
<211> 40

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-N95S-For

<400> 46
cctcaccaca actacagtgc agctattaat aagtacaacc 40

<210> 47
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-Y117N-For

<400> 47
cttagtgcta aacagcaacg ttacacctat ttgc 34

<210> 48
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-G149N-For

<400> 48
ggaagagtct tccacaaaaa cagatcagct ttagttc 37

<210> 49
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R150N/A152S-For

<400> 49
gtcttccaca aagggaactc atctttagtt cttcagtac 39

<210> 50
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R150A-For

<400> 50
gtcttccaca aaggggcatc agctttagtt cttcag 36

<210> 51
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R150E-For

<400> 51
gtcttccaca aaggggaatc agctttagtt cttcag 36

<210> 52
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R150Y-For

<400> 52
gtcttccaca aagggtactc agctttagtt cttcag 36

<210> 53
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R143Q-For

<400> 53
gtaagtggct ggggacaagt cttccacaaa ggg 33

<210> 54
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R143A-For

<400> 54
gtaagtggct ggggagcagt cttccacaaa ggg 33

<210> 55
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R143Y-For

<400> 55
gtaagtggct ggggatacgt cttccacaaa ggg 33

<210> 56
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R143L-For

<400> 56
gtaagtggct ggggactggt cttccacaaa ggg 33

<210> 57
<211> 36
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-V38M-For

<400> 57
gttttgaatg gtaaaatgga tgcattctgt ggaggc 36

<210> 58
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-V38Y-For

<400> 58
gttttgaatg gtaaatacga tgcattctgt ggaggc 36

<210> 59
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-D39M-For

<400> 59
gttttgaatg gtaaagttat ggcattctgt ggaggc 36

<210> 60
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-D39Y-For

<400> 60
gttttgaatg gtaaagttta cgcattctgt ggaggc 36

<210> 61
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-A40M-For

<400> 61
gttttgaatg gtaaagttga tatgttctgt ggaggctcta tc 42

<210> 62
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-A40Y-For

<400> 62

gttttgaatg gtaaagttga ttacttctgt ggaggctcta tc 42

<210> 63
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R233A/K230A-For

<400> 63
caaatatgga atatataccg cagtatccgc atatgtcaac tggattaag 49

<210> 64
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R233E/K230E-For

<400> 64
caaatatgga atatataccg aagtatccga atatgtcaac tggattaag 49

<210> 65
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R233A-For

<400> 65
gaatatatac caaggtatcc gcatatgtca actggattaa g 41

<210> 66
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R233E-For

<400> 66
gaatatatac caaggtatcc gaatatgtca actggattaa g 41

<210> 67
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K230A-For

<400> 67
caaatatgga atatataccg cagtatcccg gtatgtc 37

<210> 68
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K230E-For

<400> 68
caaatatgga atatataccg aagtatcccg gtatgtc 37

<210> 69
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K126E-For

<400> 69
cctatttgca ttgctgacga agaatacacg aacatc 36

<210> 70
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K126A-For

<400> 70
cctatttgca ttgctgacgc agaatacacg aacatc 36

<210> 71
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R165A-For

<400> 71
gttccacttg ttgacgcagc cacatgtctt cgatct 36

<210> 72
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R165E-For

<400> 72
gttccacttg ttgacgaagc cacatgtctt cgatct 36

<210> 73
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R170A-For

<400> 73
cgagccacat gtcttgcatc tacaaagttc acc 33

<210> 74
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R170E-For

<400> 74
cgagccacat gtcttgaatc tacaaagttc acc 33

<210> 75
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Factor IX N157D

<400> 75

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asp Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
```

```
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 76
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F de Factor IX

<400> 76

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
```

```
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 77
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A103N/N105S de Factor IX

<400> 77

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Asn Asp Ser Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
```

```
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 78
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D104N/K106S de Factor IX

<400> 78

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
```

```
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 79
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K106N/V108S de Factor IX

<400> 79

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Asn Val Ser Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
```

```
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 80
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D85N de Factor IX

<400> 80

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asn Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
```

```
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 81
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T148A de Factor IX

<400> 81

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
```

```
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 82
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K5A de Factor IX

<400> 82

```
Tyr Asn Ser Gly Ala Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 83
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D64N de Factor IX

<400> 83

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asn
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 84
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> D64A de Factor IX

<400> 84

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Ala
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 85
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> N167D de Factor IX

<400> 85

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asp Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 86
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> N167Q de Factor IX

<400> 86

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Gln Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 87
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S61A de Factor IX

<400> 87

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ala Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 88
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S53A de Factor IX

<400> 88

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ala Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 89
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T159A de Factor IX

<400> 89

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Ala Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 90
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T169A de Factor IX

<400> 90

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Ala Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 91
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T172A de Factor IX

<400> 91

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Ala Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 92
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T179A de Factor IX

<400> 92

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Ala Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 93
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155H de Factor IX

<400> 93

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp His Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 94
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155Q de Factor IX

<400> 94

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Gln Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 95
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S158A de Factor IX

<400> 95

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ala Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 96
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S158D de Factor IX

<400> 96

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Asp Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 97
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S158E de Factor IX

<400> 97

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Glu Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 98
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> N157Q de Factor IX

<400> 98

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Gln Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 99
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D203N/F205T de Factor IX

<400> 99

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asn Ala Thr Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 100
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D85N/D203N/F205T de Factor IX

<400> 100

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asn Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asn Ala Thr Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 101
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K228N de Factor IX

<400> 101

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 102
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D85N/K228N de Factor IX

<400> 102

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asn Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 103
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> I251S de Factor IX

<400> 103

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 104
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D85N/I251S de Factor IX

<400> 104

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asn Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 105
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D85N/D104N/K106S/I251S de Factor IX

<400> 105

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asn Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 106
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A262S de Factor IX

<400> 106

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ser Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 107
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K413N de Factor IX

<400> 107

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Asn Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 108
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> E410N de Factor IX

<400> 108

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 109
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> E239N de Factor IX

<400> 109

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Asn Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 110
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T241N/H243S de 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 Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Asn Glu Ser Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 111
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S de Factor IX

<400> 111

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 112
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> L321N de Factor IX

<400> 112

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Asn Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 113
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> F314N/H315S de Factor IX

<400> 113

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Asn Ser Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 114
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K392N/K394S de Factor IX

<400> 114

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Asn Gly Ser Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 115
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> S319N/L321S de Factor IX

<400> 115

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Asn Ala
305                 310                 315                 320
Ser Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 116
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> N260S de Factor IX

<400> 116

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 117
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y284N de Factor IX

<400> 117

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Asn Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 118
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> G317N de Factor IX

<400> 118

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Asn Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 119
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318N/A320S de Factor IX

<400> 119

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Asn Ser Ser
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 120
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318A de Factor IX

<400> 120

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Ala Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 121
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318E de Factor IX

<400> 121

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Glu Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 122
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y de Factor IX

<400> 122

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 123
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R312Q de Factor IX

<400> 123

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Gln Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 124
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R312A de Factor IX

<400> 124

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Ala Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 125
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R312Y de Factor IX

<400> 125

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Tyr Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 126
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R312L de Factor IX

<400> 126

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Leu Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 127
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V202M de Factor IX

<400> 127

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Met Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 128
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V202Y de Factor IX

<400> 128

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Tyr Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 129
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D203M de Factor IX

<400> 129

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Met Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 130
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D203Y de Factor IX

<400> 130

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Tyr Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 131
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A204M de Factor IX

<400> 131

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Met Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 132
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A204Y de Factor IX

<400> 132

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Tyr Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 133
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K400A/R403A de Factor IX

<400> 133

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Ala
385                 390                 395                 400
Val Ser Ala Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 134
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K400E/R403E de Factor IX

<400> 134

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Glu
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 135
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R403A de Factor IX

<400> 135

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Ala Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 136
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R403E de Factor IX

<400> 136

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 137
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K400A de Factor IX

<400> 137

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Ala
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 138
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K400E de Factor IX

<400> 138

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Glu
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 139
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K293E de Factor IX

<400> 139

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Glu Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 140
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K293A de Factor IX

<400> 140

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Ala Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 141
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R333A de Factor IX

<400> 141

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Ala Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 142
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R333E de Factor IX

<400> 142

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Glu Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 143
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R338A de Factor IX

<400> 143

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Ala Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 144
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R338E de Factor IX

<400> 144

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 145
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R338A/R403A de Factor IX

<400> 145

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Ala Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Ala Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 146
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R338E/R403E de Factor IX

<400> 146

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 147
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K293A/R403A de Factor IX

<400> 147

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Ala Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Ala Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 148
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K293E/R403E de Factor IX

<400> 148

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Glu Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 149
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K293A/R338A/R403A de Factor IX

<400> 149

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Ala Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Ala Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Ala Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 150
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K293E/R338E/R403E de Factor IX

<400> 150

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Glu Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 151
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318A/R403A de Factor IX

<400> 151

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Ala Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Ala Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 152
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318E/R403E de Factor IX

<400> 152

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Glu Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 153
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/E410N de Factor IX

<400> 153

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 154
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R338E/E410N de Factor IX

<400> 154

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 155
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 155

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 156
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/R338E/R403E de Factor IX

<400> 156

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 157
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D203N/F205T/K228N de Factor IX

<400> 157

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asn Ala Thr Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 158
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D203N/F205T/E410N de Factor IX

<400> 158

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asn Ala Thr Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 159
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D203N/F205T/R338E de Factor IX

<400> 159

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asn Ala Thr Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 160
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D203N/F205T/R338A de Factor IX

<400> 160

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asn Ala Thr Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Ala Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 161
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D203N/F205T/R318Y de Factor IX

<400> 161

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asn Ala Thr Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 162
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D203N/F205T/R338E/R403E de Factor IX

<400> 162

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asn Ala Thr Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 163
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K228N/E410N de Factor IX

<400> 163

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 164
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K228N/R338E de Factor IX

<400> 164

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 165
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K228N/R338A de Factor IX

<400> 165

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Ala Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 166
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K228N/R318Y de Factor IX

<400> 166

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 167
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K228N/R338E/R403E de Factor IX

<400> 167

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 168
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R403E/E410N de Factor IX

<400> 168

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 169
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/R338E/E410N de Factor IX

<400> 169

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 170
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K228N/R318Y/E410N de Factor IX

<400> 170

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 171
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/R403E/E410N de Factor IX

<400> 171

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 172
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 172

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 173
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D203N/F205T/R318Y/E410N de Factor IX

<400> 173

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asn Ala Thr Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 174
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> E410Q de Factor IX

<400> 174

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Gln Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 175
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> E410S de Factor IX

<400> 175

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Ser Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 176
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> E410A de Factor IX

<400> 176

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Ala Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 177
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F314N/K316S de Factor IX

<400> 177

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Asn His Ser Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 178
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A103N/N105S/K247N/N249S de Factor IX

<400> 178

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Asn Asp Ser Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 179
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/K247N/N249S de Factor IX

<400> 179

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 180
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> K228N/I251S de Factor IX

<400> 180

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 181
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A103N/N105S/I251S de Factor IX

<400> 181

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Asn Asp Ser Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 182
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/I251S de Factor IX

<400> 182

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 183
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> K228N/K247N/N249S de Factor IX

<400> 183

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 184
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/K228N/K247N/N249S de Factor IX

<400> 184

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 185
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/N260S de Factor IX

<400> 185

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 186
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> R333S de Factor IX

<400> 186

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Ser Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 187
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> R333L de Factor IX

<400> 187

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Leu Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 188
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> R318Y/R338E de Factor IX

<400> 188

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 189
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> K316N de Factor IX

<400> 189

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Asn Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 190
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> K316A de Factor IX

<400> 190

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Ala Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 191
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> K316E de Factor IX

<400> 191

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Glu Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 192
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> K316S de Factor IX

<400> 192

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Ser Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 193
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> K316M de Factor IX

<400> 193

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Met Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 194
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> E239S de Factor IX

<400> 194

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Ser Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 195
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> E239A de Factor IX

<400> 195

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Ala Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 196
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> E239R de Factor IX

<400> 196

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Arg Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 197
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> E239K de Factor IX

<400> 197

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Lys Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 198
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H257F de Factor IX

<400> 198

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
Phe Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 199
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H257Y de Factor IX

<400> 199

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
Tyr Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 200
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H257E de Factor IX

<400> 200

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
Glu Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 201
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H257S de Factor IX

<400> 201

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
Ser Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 202
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> T412A de Factor IX

<400> 202

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Ala Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 203
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> T412V de Factor IX

<400> 203

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Val Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 204
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> E410N/T412A de Factor IX

<400> 204

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Ala Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 205
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> E410N/T412V de Factor IX

<400> 205

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Val Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 206
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> E410D de Factor IX

<400> 206

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asp Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 207
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> N346D de Factor IX

<400> 207

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 208
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> N346Y de Factor IX

<400> 208

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Tyr Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 209
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> T343R de Factor IX

<400> 209

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 210
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> T343E de Factor IX

<400> 210

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Glu Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 211
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> T343Q de Factor IX

<400> 211

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Gln Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 212
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F342I de Factor IX

<400> 212

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Ile Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 213
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y345A de Factor IX

<400> 213

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Ala Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 214
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y345T de Factor IX

<400> 214

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Thr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 215
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> T343R/Y345T de Factor IX

<400> 215

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Thr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 216
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y259F/K265T/Y345T de Factor IX

<400> 216

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Phe Asn Ala Ala Ile Asn Thr Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Thr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 217
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A103N/N105S/K228N de Factor IX

<400> 217

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Asn Asp Ser Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 218
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/K228N de Factor IX

<400> 218

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 219
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 219

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Asn Asp Ser Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 220
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 220

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 221
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 221

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 222
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 222

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 223
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 223

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 224
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N de Factor IX

<400> 224

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 225
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> I251S/R318Y/R338E/E410N de Factor IX

<400> 225

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 226
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N de Factor IX

<400> 226

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 227
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A103N/N105S/Y155F de Factor IX

<400> 227

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Asn Asp Ser Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 228
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/Y155F de Factor IX

<400> 228

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 229
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/K228N de Factor IX

<400> 229

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 230
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/I251S de Factor IX

<400> 230

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 231
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S de Factor IX

<400> 231

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 232
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 232

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Asn Asp Ser Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 233
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 233

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 234
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 234

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 235
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 235

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Asn Asp Ser Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 236
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<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 Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 237
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 237

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 238
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 238

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 239
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 239

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 240
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 240

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 241
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 241

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 242
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N de Factor IX

<400> 242

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 243
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/R318Y/R338E/E410N de Factor IX

<400> 243

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 244
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N de Factor IX

<400> 244

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 245
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S de Factor IX

<400> 245

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 246
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S de Factor IX

<400> 246

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 247
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/Y155F/K228N de Factor IX

<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 Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 248
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/K228N/K247N/N249S de Factor IX

<400> 248

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 249
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> R318Y/R338E/R403E/E410S de Factor IX

<400> 249

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Ser Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 250
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V de Factor IX

<400> 250

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Val Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 251
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A de Factor IX

<400> 251

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Ala Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 252
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> R318Y/R338E/R403E/T412A de Factor IX

<400> 252

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Ala Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 253
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> R318Y/R338E/E410S de Factor IX

<400> 253

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Ser Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 254
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> R318Y/R338E/T412A de Factor IX

<400> 254

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Ala Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 255
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> R318Y/R338E/E410N/T412V de Factor IX

<400> 255

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Val Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 256
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 256

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asn Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 257
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 257

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 258
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N de Factor IX

<400> 258

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 259
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/N346D de Factor IX

<400> 259

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 260
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N de Factor IX

<400> 260

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 261
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/N260S/N346D de Factor IX

<400> 261

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 262
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> K247N/N249S/N260S de Factor IX

<400> 262

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 263
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/N260S de Factor IX

<400> 263

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 264
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 264

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 265
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 265

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 266
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 266

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 267
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 267

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 268
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> R338E/T343R de Factor IX

<400> 268

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 269
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/Y155F/N260S de Factor IX

<400> 269

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 270
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/N260S de Factor IX

<400> 270

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 271
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/K247N/N249S/N260S de Factor IX

<400> 271

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 272
<211> 415
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S de Factor IX

<400> 272

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 273
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-D[64]N-For

<400> 273
ggcggcagtt gcaagaacga cattaattcc tatg 34

<210> 274
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-D[64]A-For

<400> 274
ggcggcagtt gcaaggctga cattaattcc tatg 34

<210> 275
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-N[157]Q-For

<400> 275
cctgatgtgg actatgtaca gtctactgaa gctgaaacc 39

<210> 276
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-N[157]D-For

<400> 276
cctgatgtgg actatgtaga ctctactgaa gctgaaacc 39

<210> 277
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-N[167]Q-For

<400> 277
gaaaccattt tggatcagat cactcaaagc acc 33

<210> 278
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-N[167]D-For

<400> 278
gaaaccattt tggatgacat cactcaaagc acc 33

<210> 279
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-S[61]A-For

<400> 279
ccatgtttaa atggcggcgc ttgcaaggat gacattaatt cc 42

<210> 280
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-S[53]A-For

<400> 280
gatggagatc agtgtgaggc taatccatgt ttaaatggc 39

<210> 281
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-T[159]A-For

<400> 281
gtggactatg taaattctgc tgaagctgaa accattttg 39

<210> 282
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-T[169]A-For

<400> 282
cattttggat aacatcgctc aaagcaccca atcatttaat gac 43

<210> 283
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-T[172]A-For

<400> 283
gataacatca ctcaaagcgc tcaatcattt aatgac 36

<210> 284
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-T[179]A-For

<400> 284
caatcattta atgacttcgc tcgggttgtt ggtggagaag 40

<210> 285
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> F9-Y[155]F-For

<400> 285
gtttttcctg atgtggactt cgtaaattct actgaagctg 40

<210> 286
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-Y[155]H-For

<400> 286
gtttttcctg atgtggacca cgtaaattct actgaagctg 40

<210> 287
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-Y[155]Q-For

<400> 287
gtttttcctg atgtggacca ggtaaattct actgaagctg 40

<210> 288
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-S[158]A-For

<400> 288
gtggactatg taaatgctac tgaagctgaa acc 33

<210> 289
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-S[158]D-For

<400> 289
gtggactatg taaatgacac tgaagctgaa acc 33

<210> 290
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-S[158]E-For

<400> 290
gtggactatg taaatgagac tgaagctgaa acc 33

<210> 291

<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R165S-For

<400> 291
gttccacttg ttgacagcgc cacatgtctt cgatct 36

<210> 292
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-R170L-For

<400> 292
cgagccacat gtcttctgtc tacaaagttc acc 33

<210> 293
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K148N-For

<400> 293
ggaagagtct tccacaacgg gagatcagct ttag 34

<210> 294
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K148A-For

<400> 294
ggaagagtct tccacgctgg gagatcagct ttag 34

<210> 295
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K148E-For

<400> 295
ggaagagtct tccacgaggg gagatcagct ttag 34

<210> 296
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K148S-For

<400> 296
ggaagagtct tccacagcgg gagatcagct ttag 34

<210> 297
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-K148M-For

<400> 297
ggaagagtct tccacatggg gagatcagct ttag 34

<210> 298
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-E74S-For

<400> 298
ggtgaacata atattagcga gacagaacat acag 34

<210> 299
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-E74A-For

<400> 299
ggtgaacata atattgctga gacagaacat acag 34

<210> 300
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-E74R-For

<400> 300
ggtgaacata atattaggga gacagaacat acag 34

<210> 301
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-E74K-For

<400> 301
ggtgaacata atattaagga gacagaacat acag 34

<210> 302
<211> 32

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-H92F-For-Corr

<400> 302
cgaattattc ctcacttcaa ctacaatgca gc 32

<210> 303
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-H92Y-For-Corr

<400> 303
cgaattattc ctcactacaa ctacaatgca gc 32

<210> 304
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-H92E-For-Corr

<400> 304
cgaattattc ctcacgaaaa ctacaatgca gc 32

<210> 305
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-H92S-For-Corr

<400> 305
cgaattattc ctcacagcaa ctacaatgca gc 32

<210> 306
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-T242A-For

<400> 306
ctggattaag gaaaaagcta agctcactta agtg 34

<210> 307
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-T242V-For

<400> 307
ctggattaag gaaaaagtga agctcactta agtg 34

<210> 308
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-E240N/T242A-For

<400> 308
gtcaactgga ttaagaacaa agctaagctc acttaagtg 39

<210> 309
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-E240N/T242V-For

<400> 309
gtcaactgga ttaagaacaa agtgaagctc acttaagtg 39

<210> 310
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-E240Q-For

<400> 310
gtcaactgga ttaagcagaa aacaaagctc acttaag 37

<210> 311
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-E240S-For

<400> 311
gtcaactgga ttaagagcaa aacaaagctc acttaag 37

<210> 312
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-E240A-For

<400> 312
gtcaactgga ttaaggctaa aacaaagctc acttaag 37

<210> 313
<211> 37
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-E240D-For

<400> 313
gtcaactgga ttaaggacaa aacaaagctc acttaag 37

<210> 314
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-N178D-For

<400> 314
caaagttcac catctatgac aacatgttct gtgctggc 38

<210> 315
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-N178Y-For

<400> 315
caaagttcac catctattac aacatgttct gtgctggc 38

<210> 316
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-Y177A-For

<400> 316
ctacaaagtt caccatcgct aacaacatgt tctgtgc 37

<210> 317
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-Y177T-For

<400> 317
ctacaaagtt caccatcacc aacaacatgt tctgtgc 37

<210> 318
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-T175R-For

<400> 318

cttcgatcta caaagttcag gatctataac aacatgttc 39

<210> 319
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-T175E-For

<400> 319
cttcgatcta caaagttcga aatctataac aacatgttc 39

<210> 320
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-T175Q-For

<400> 320
cttcgatcta caaagttcca gatctataac aacatgttc 39

<210> 321
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-F174I/Y177T-For

<400> 321
gtcttcgatc tacaaagatc accatctata acaacatg 38

<210> 322
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-T175R/Y177T-For

<400> 322
cgatctacaa agttcaggat caccaacaac atgttctgtg 40

<210> 323
<211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-Y94F/K98T-For

<400> 323
gaattattcc tcaccacaac ttcaatgcag ctattaatac ctacaaccat gacattg 57

<210> 324
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F9-F145N/K148S-For

<400> 324
ggctggggaa gagtcaacca cagcgggaga tcagctttag 40

<210> 325
<211> 461
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> precursor BeneFIX

<400> 325

```
Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
 1               5                  10                  15
Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
            20                  25                  30
Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
        35                  40                  45
Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
    50                  55                  60
Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65                  70                  75                  80
Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
                85                  90                  95
Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
            100                 105                 110
Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
        115                 120                 125
Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
    130                 135                 140
Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145                 150                 155                 160
Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
                165                 170                 175
Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
            180                 185                 190
Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
        195                 200                 205
Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
    210                 215                 220
Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
```

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

<210> 326
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D104N/K106S/Y155F/K247N/ N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 326

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
```

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

<210> 327
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> D104N/K106S/K228N/K247N/ N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 327

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
```

```
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 328
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K228N/K247N/N249S/ R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 328

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
```

```
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 329
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/N260S/ R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 329

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1                5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
```

```
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 330
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 330

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
```

```
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 331
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapeins

<220>
<223> D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 331

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asn Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 332
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T343R/N346Y de Factor IX

<400> 332

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Tyr Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 333
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N de Factor IX

<400> 333

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Tyr Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 334
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N de Factor IX

<400> 334

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Tyr Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 335
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T343R/N346D de Factor IX

<400> 335

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 336
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N de Factor IX

<400> 336

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 337
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N de Factor IX

<400> 337

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Ala Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 338
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/E410N Factor de IX

<400> 338

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Ala Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 339
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E de Factor IX

<400> 339

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 340
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E de Factor IX

<400> 340

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 341
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N de Factor IX

<400> 341

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 342
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N de Factor IX

<400> 342

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 343
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 343

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 344
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 344

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 345
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/R338E/T343R/R403E de Factor IX

<400> 345

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 346
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E de Factor IX

<400> 346

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 347
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/R338E/T343R/E410N de Factor IX

<400> 347

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 348
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N de Factor IX

<400> 348

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 349
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 349

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 350
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 350

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 351
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R338E/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 351

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 352
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 352

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
```

```
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 353
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 353

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
```

```
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 354
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 354

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

```
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 355
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 355

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

```
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 356
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 356

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

```
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 357
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 357

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

```
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 358
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410N de Factor IX

<400> 358

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

```
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 359
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 359

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

```
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 360
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/ R338E/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 360

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

```
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 361
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R338E/T343R/R403E de Factor IX

<400> 361

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

```
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 362
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R338E/T343R/R403E de Factor IX

<400> 362

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

```
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 363
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S de Factor IX

<400> 363

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

```
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Ser Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 364
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E de Factor IX

<400> 364

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

```
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Ser Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 365
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E de Factor IX

<400> 365

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

```
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ser Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 366
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S de Factor IX

<400> 366

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

```
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Ser Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 367
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F \/K247N/N249S/T343R/R403E de Factor IX

<400> 367

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

```
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 368
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E de Factor IX

<400> 368

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

```
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 369
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E de Factor IX

<400> 369

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

```
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 370
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/ R403E/E410N de Factor IX

<400> 370

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

```
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 371
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 371

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

```
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 372
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E de Factor IX

<400> 372

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

```
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 373
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R de Factor IX

<400> 373

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

```
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 374
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E de Factor IX

<400> 374

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

```
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 375
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N de Factor IX

<400> 375

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

```
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 376
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E de Factor IX

<400> 376

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

```
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 377
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R de Factor IX

<400> 377

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

```
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 378
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N de Factor IX

<400> 378

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

```
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 379
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N de Factor IX

<400> 379

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

```
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 380
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 380

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 381
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 381

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 382
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N de Factor IX

<400> 382

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 383
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E de Factor IX

<400> 383

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 384
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E de Factor IX

<400> 384

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 385
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N de Factor IX

<400> 385

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 386
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N de Factor IX

<400> 386

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 387
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E de Factor IX

<400> 387

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 388
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/R338E/T343R/R403E de Factor IX

<400> 388

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 389
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/E410N de Factor IX

<400> 389

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 390
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/R338E/T343R/E410N de Factor IX

<400> 390

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 391
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 391

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 392
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 392

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 393
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R318Y/R338E/T343R de Factor IX

<400> 393

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 394
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/R338E/T343R de Factor IX

<400> 394

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 395
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R318Y/T343R/R403E de Factor IX

<400> 395

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 396
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 396

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 397
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R de Factor IX

<400> 397

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 398
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R de Factor IX

<400> 398

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 399
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N de Factor IX

<400> 399

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 400
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N de Factor IX

<400> 400

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 401
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R338E/T343R/E410N de Factor IX

<400> 401

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 402
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R338E/T343R/E410N de Factor IX

<400> 402

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 403
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R318Y/T343R/E410N de Factor IX

<400> 403

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 404
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318Y/T343R/E410N de Factor IX

<400> 404

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 405
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N de Factor IX

<400> 405

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
```

```
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 406
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E de Factor IX

<400> 406

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
```

```
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 407
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N de Factor IX

<400> 407

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
            20                  25                  30
```

```
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 408
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/ R403E/E410N de Factor IX

<400> 408

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
```

```
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Asn Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Asn Arg Ser Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Arg Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 409
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R338E/R403E/E410N de Factor IX

<400> 409

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
```

```
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Glu Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 410
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R318Y/R338E/R403E de Factor IX

<400> 410

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
```

```
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Glu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 411
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y155F/R318Y/R403E/E410N de Factor IX

<400> 411

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
```

```
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Phe Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Tyr Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Glu Tyr Val Asn Trp Ile Lys Asn Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 412
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y1N de Factor IX

<400> 412

```
Asn Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
```

```
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 413
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318F de Factor IX

<400> 413

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
```

```
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Phe Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 414
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R318W de Factor IX

<400> 414

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
```

```
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Trp Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

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

<220>
<223> Y155L de Factor IX

<400> 415

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
```

```
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Leu Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 416
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T343D de Factor IX

<400> 416

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
```

```
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Asp Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

<210> 417
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> R403D de Factor IX

<400> 417

```
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1               5                  10                  15
Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
```

```
            20                  25                  30
Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
        35                  40                  45
Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50                  55                  60
Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65                  70                  75                  80
Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
                85                  90                  95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
            100                 105                 110
Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
        115                 120                 125
Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130                 135                 140
Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
                165                 170                 175
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
            180                 185                 190
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210                 215                 220
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225                 230                 235                 240
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
                245                 250                 255
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
        275                 280                 285
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400
Val Ser Asp Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
                405                 410                 415
```

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido FIX modificado, que comprende un reemplazo de aminoácidos en un polipéptido FIX no modificado, en el que:

el reemplazo de aminoácidos se selecciona de entre R318Y, R318E, R318F y R318W en un polipéptido FIX maduro que tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3, o el mismo reemplazo en un residuo de aminoácido correspondiente en un polipéptido FIX no modificado;

residuos de aminoácidos correspondientes se identifican mediante alineación del polipéptido FIX no modificado con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3;

el polipéptido FIX no modificado consiste de una secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NOS: 2, 3, 20 o 325 o es FIXa no modificado, que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3;

el polipéptido FIX modificado consiste de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 modificaciones adicionales;

modificaciones son reemplazos, adiciones o supresiones de aminoácidos, o cualquier combinación de los mismos;

la forma FIXa modificada del polipéptido FIX exhibe aumento de la actividad procoagulante en comparación con la forma FIXa no modificado del polipéptido FIX que no tienen las modificaciones; y

actividad procoagulante se evalúa en un ensayo que mide actividad coagulante de sangre.

2. El polipéptido FIX modificado de la reivindicación 1 que comprende un reemplazo de aminoácidos R318Y.

3. El polipéptido FIX modificado de la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende el reemplazo de aminoácidos T343R, T343E o T343D, o el mismo reemplazo en un residuo de aminoácido correspondiente en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325.

4. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende adicionalmente un reemplazo de aminoácidos a R338 o a un residuo que corresponde a 338 en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

5. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende un reemplazo de aminoácidos R338D o R338E o el mismo reemplazo en un residuo de aminoácido correspondiente en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

6. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que comprende un reemplazo de aminoácidos R338E.

7. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende los reemplazos de aminoácidos R318Y/R338E o los mismos reemplazos en residuos de aminoácidos correspondientes en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

8. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que comprende un reemplazo de aminoácidos T343R, T343E o T343D o el mismo reemplazo en un residuo de aminoácido correspondiente en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

9. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 que comprende un reemplazo de aminoácidos T343R.

10. El polipéptido FIX modificado de la reivindicación 9 que comprende los reemplazos de aminoácidos R318Y/R338E/T343R.

11. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende los reemplazos de aminoácidos R318Y/T343R o los mismos reemplazos en residuos de aminoácidos correspondientes en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

12. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende adicionalmente un reemplazo de aminoácidos a E410 o en un residuo de aminoácidos que corresponde a residuo de aminoácidos E410 en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3, en el que el reemplazo es N o S.

13. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 que comprende los reemplazos de aminoácidos R318Y/E410N o los mismos reemplazos en residuos de aminoácidos correspondientes en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

14. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende un reemplazo de aminoácidos R318Y y un reemplazo de aminoácidos en un residuo de aminoácidos seleccionado de entre residuos 338, 343, 403 y 410 de un polipéptido FIX maduro que tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3 o en residuos de aminoácidos que corresponde a residuos 338, 343, 403 o 410 en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

15. El polipéptido FIX modificado de la reivindicación 14, que comprende un reemplazo de aminoácidos seleccionado de entre R338E, T343R, R403E y E410N en un polipéptido FIX maduro que tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3 o los mismos reemplazos en residuos de aminoácidos correspondientes en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

16. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-15 que comprende reemplazos de aminoácidos seleccionados de entre reemplazos R318Y/R338E/R403E/E410N, R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, R318Y/R338E/T343R/E410N, Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E, Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E, K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E, R318Y/R338E/T343R, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R, K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E, R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E, K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R, R318Y/T343R/E410N, Y155F/R318Y/R338E/R403E, R318Y/R338E/R403E, R318Y/R338E/E410N, K228N/R318Y/E410N, R318Y/R403E/E410N, D203N/F205T/R318Y/E410N, A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N, K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N, 1251S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/1251S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N,1251S/R318Y/E410N/R338E, D104N/K106S/1251S/R318Y/R338E/E410N, A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N, K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N, K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N, Y155F/R318Y/R338E/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N,R318Y/R338E/R403E/E410S, R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V,R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A, R318Y/R338E/R403E/T412A, R318Y/R338E/E410S, R318Y/R338E/T412A, R318Y/R338E/E410N/T412V, D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N, N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N, R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N, Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N, K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N, D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N, R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N, R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N, R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N, K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N, R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E, K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N,

K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N, R318Y/R338E/T343R/R403E, Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N, R318Y/T343R/R403E/E410N, Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N, N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E, Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N, K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N, K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E, K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E, Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N, K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N, Y155F/R318Y/R338E/T343R, Y155F/R318Y/T343R/R403E, Y155F/R318Y/T343R/E410N, K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N, K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N y Y155F/R318Y/R403E/E410N, o los mismos reemplazos en residuos de aminoácidos correspondientes en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

17. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 que comprende los reemplazos de aminoácidos R318Y/R338E/R403E/E410N, R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, R318Y/R338E/T343R/E410N, Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E, Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E, K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E, R318Y/R338E/T343R, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R, K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N, K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E, R318Y/R338E/T343R/R403E/E41 0S, Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E, K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R, R318Y/T343R/E410N o Y155F/R318Y/R338E/R403E.

18. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 que comprende los reemplazos de aminoácidos R318Y/R338E/R403E/E410N, R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N o R318Y/R338E/T343R/E410N.

19. El polipéptido FIX modificado de la reivindicación 3, que comprende un reemplazo de aminoácidos en un residuo de aminoácidos seleccionado de entre D203, F205 y K228, o en un residuo de aminoácidos que corresponde a residuo de aminoácidos D203, F205 o K228 en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

20. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, que comprende un reemplazo de aminoácidos seleccionado de entre D203N, F205T y K228N, o el mismo reemplazo de aminoácidos en un residuo de aminoácido correspondiente en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

21. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, que comprende los reemplazos de aminoácidos D203N/F205T/R318Y o K228N/R318Y, o los mismos reemplazos en residuos de aminoácidos correspondientes en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

22. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-21 que comprende un reemplazo de aminoácidos en la posición del aminoácido Y155, o a un residuo que corresponde a 155 en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3, que se selecciona de F o L.

23. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-22 que comprende el reemplazo de aminoácidos Y155F o el mismo reemplazo en un residuo de aminoácido correspondiente en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

24. El polipéptido FIX modificado de la reivindicación 22 o reivindicación 23 que comprende adicionalmente un reemplazo de aminoácidos en el residuo 103, 104, 105, 106, 228, 251, 260 o 346 de un polipéptido FIX maduro que tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3, o en un residuo de aminoácidos que corresponde a 103, 104, 105,

106, 228, 251, 260 o 346 en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

25. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-24 que comprende un reemplazo de aminoácidos seleccionado de entre A103N, D104N, N105S, K106S, K228N, I251S, N260S y N346D, o el mismo reemplazo en un residuo de aminoácido correspondiente en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

26. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-25 que comprende reemplazos de aminoácidos seleccionados de entre Y155F/K228N, Y155F/I251S, D104N/K106S/Y155F/K228N, Y155F/N346D, Y155F/N260S, Y155F/N260S/N346D, D104N/K106S/Y155F/N260S, D104N/K106S/Y155F/K228N, A103N/N105S/Y155F y D104N/K106S/Y155F, o los mismos reemplazos en residuos de aminoácidos correspondientes en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

27. El polipéptido FIX modificado de la reivindicación 22 o reivindicación 23 que comprende adicionalmente un reemplazo de aminoácidos en un residuo seleccionado de entre 338, 403 y 410 de un polipéptido FIX maduro que tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3, o en un residuo de aminoácidos que corresponde a 338, 403 o 410 en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

28. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-27 que comprende un reemplazo de aminoácidos seleccionado de entre R338E, R403E y E410N, o el mismo reemplazo en un residuo de aminoácido correspondiente en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

29. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-28, que comprende los reemplazos de aminoácidos seleccionados de los reemplazos R318E/R403E, E410N/T412A o E410N/T412V, o los mismos reemplazos en residuos de aminoácidos correspondientes en un polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o en el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

30. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-29, que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 122, 153, 156, 161, 166, 169-173, 188, 219-226, 232-244, 249-258, 260, 264-267, 326-331, 333, 334, 336-341, 342, 345-350, 353-360, 366, 368, 369, 372-375, 378-381, 383-386, 393-395, 397, 398, 403-408, 410 y 411.

31. El polipéptido FIX modificado de la reivindicación 30 que consiste de la secuencia de los residuos de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 394.

32. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-31 que es un polipéptido maduro.

33. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-32 que es un polipéptido de dos cadenas

34. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-32 que es un polipéptido de cadena sencilla.

35. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-34 que es activo o está activado.

36. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-35 que comprende una modificación química o una modificación postraduccional.

37. El polipéptido FIX modificado de la reivindicación 36, en el que las modificaciones se seleccionan de entre glicosilación, carboxilación, hidroxilación, sulfatación, fosforilación, albuminación y conjugación a una fracción de polietilenglicol (PEG).

38. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-37, que comprende hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 reemplazos de aminoácidos en comparación con el polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2 o 3.

39. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-37, en el que el polipéptido FIX modificado tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 modificaciones que introducen y/o eliminan uno o más sitios de glicosilación en comparación con el polipéptido FIX no modificado de la SEQ ID NO: 2, 3, 20 o 325, o con el polipéptido FIXa que consiste de una cadena ligera que consiste de los residuos 1-145, y una cadena pesada que consiste de los residuos 181-415, de la SEQ ID NO: 3.

40. Una molécula de ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-39.

41. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 40.

42. El vector de la reivindicación 41, en el que el vector es un vector procariota, un vector viral o un vector eucariota.

43. El vector de la reivindicación 41 o reivindicación 42, en el que el vector es un vector viral o un vector de levadura.

44. El vector de la reivindicación 43, en el que el vector es un vector viral seleccionado de entre un adenovirus, un virus asociado a adeno, un retrovirus, un virus herpes, un lentivirus, un poxvirus, y un citomegalovirus.

45. Una célula, que comprende el vector de cualquiera de las reivindicaciones 41-44.

46. La célula de la reivindicación 45, que es una célula eucariota.

47. La célula de la reivindicación 46, en el que la célula eucariota es una célula de mamífero.

48. La célula de la reivindicación 47, en el que la célula de mamífero se selecciona de entre células de riñón de hámster bebé (BHK-21) o células 293 o células CHO.

49. Una composición farmacéutica, que comprende el polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-39 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50. La composición farmacéutica de la reivindicación 49 que se formula para administración local, sistémica o tópica.

51. La composición farmacéutica de la reivindicación 49 que se formula para administración oral, nasal, pulmonar, bucal, transdérmica, subcutánea, intraduodenal, entérica, parenteral, intravenosa, o intramuscular.

52. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 49-51 que se formula para liberación controlada.

53. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 49-51 que se formula para administración de dosificación única.

54. El polipéptido FIX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-39 para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección que se trata mediante administración de FIX o un procoagulante, en el que la enfermedad o afección que se va a tratar se selecciona de entre trastornos de coagulación de la sangre, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilias, y trastornos hemorrágicos.

55. Uso de la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 49-53 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección que se trata mediante administración de FIX o un procoagulante, en el que la enfermedad o afección que se va a tratar se selecciona de entre trastornos de coagulación de la sangre, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilias, y trastornos hemorrágicos.

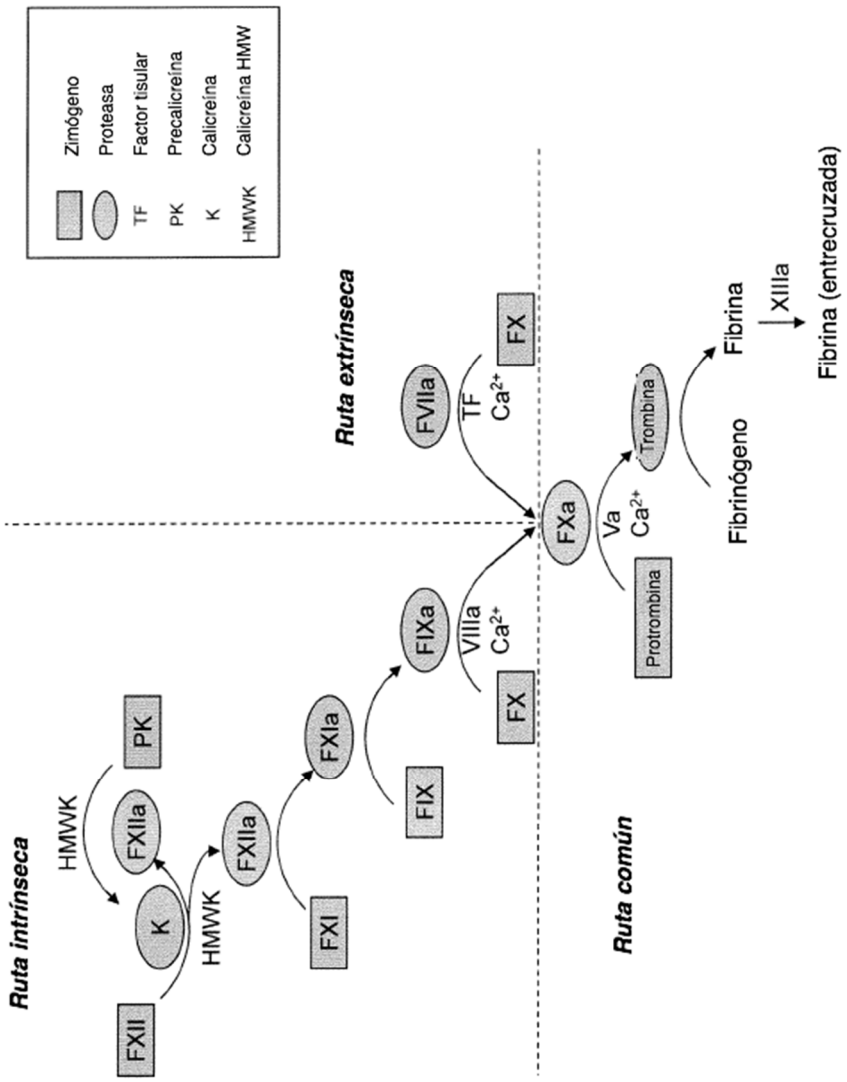


Figura 1. Cascada de Coagulación

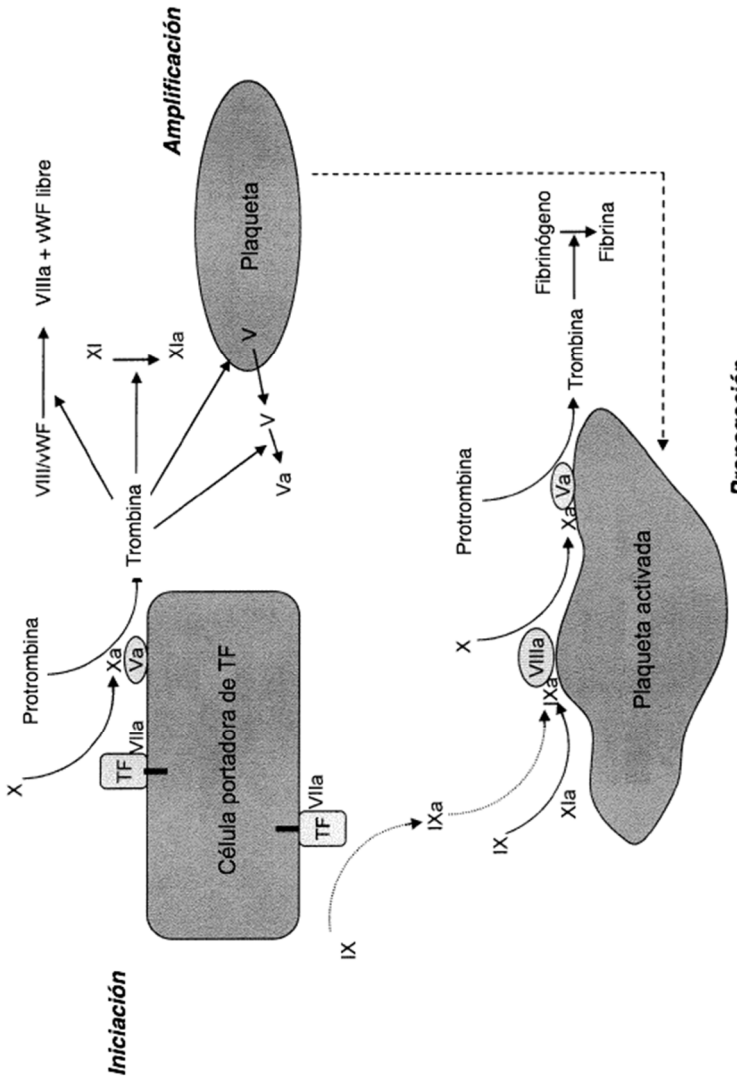


Figura 2. Modelo de coagulación basado en células

```
SEQ ID NO:20          ----------------------------------------------------------YNSGKLEEFVQGNL 14
SEQ ID NO:325         MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNL 60
SEQ ID NO:2           MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNL 60
SEQ ID NO:3           ----------------------------------------------------------YNSGKLEEFVQGNL 14
SEQ ID NO:4           MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNL 60
SEQ ID NO:267         ----------------------------------------------------------YNSGKLEEFVQGNL 14
SEQ ID NO:366         ----------------------------------------------------------YNSGKLEEFVQGNL 14
SEQ ID NO:360         ----------------------------------------------------------YNSGKLEEFVQGNL 14
SEQ ID NO:406         ----------------------------------------------------------YNSGKLEEFVQGNL 14
SEQ ID NO:346         ----------------------------------------------------------YNSGKLEEFVQGNL 14
SEQ ID NO:172         ----------------------------------------------------------YNSGKLEEFVQGNL 14
SEQ ID NO:347         ----------------------------------------------------------YNSGKLEEFVQGNL 14
SEQ ID NO:365         ----------------------------------------------------------YNSGKLEEFVRGNL 14
7,700,734             ----------------------------------------------------------YNSGKLEEFVQGNL 14
7,125,841             MQRVNMIMAESPSLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNL 60
SEQ ID NO:5           MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNL 60
SEQ ID NO:14          ----------------------------------------------------------YNSGKLEEFVRGNL 14
                                                                                 **********:***

SEQ ID NO:20          ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 74
SEQ ID NO:325         ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 120
SEQ ID NO:2           ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 120
SEQ ID NO:3           ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 74
SEQ ID NO:4           ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 120
SEQ ID NO:267         ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 74
SEQ ID NO:366         ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 74
SEQ ID NO:360         ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 74
SEQ ID NO:406         ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 74
SEQ ID NO:346         ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 74
SEQ ID NO:172         ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 74
SEQ ID NO:347         ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 74
SEQ ID NO:365         ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 74
7,700,734             ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 74
7,125,841             ERECMEEKCSFEEPREVFENTEKITEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 120
SEQ ID NO:5           ERECMEEKCNFEEAREVFENTEKTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCP 120
SEQ ID NO:14          ERECKEEKCSFEEAREVFENTEKTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGMCKDDINSYECWCQ 74
                      **** ***** .***.********** ********************** ************
```

Figura 3

```
SEQ ID NO:20      FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 134
SEQ ID NO:325     FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 180
SEQ ID NO:2       FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 180
SEQ ID NO:3       FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 134
SEQ ID NO:4       FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 180
SEQ ID NO:267     FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 134
SEQ ID NO:366     FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 134
SEQ ID NO:360     FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 134
SEQ ID NO:406     FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 134
SEQ ID NO:346     FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 134
SEQ ID NO:172     FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 134
SEQ ID NO:347     FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 134
SEQ ID NO:365     FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 134
7,700,734         FGFEGKNCELDATCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 134
7,125,841         FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR 180
SEQ ID NO:5       FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCKQFCKNTADNKVVCSCTEGYRLAENQRSCEPAVPFPCGR 180
SEQ ID NO:14      AGFEGTNCELDATCSIKNGRCKQFCKRDTDNKVVCSCTDGYRLAEDQKSCEPAVPFPCGR 134
                    ****.*****.**.******:****.  :*********:******:*:**********

SEQ ID NO:20      VSVSQTS-KLTRAEAVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 193
SEQ ID NO:325     VSVSQTS-KLTRAEAVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 239
SEQ ID NO:2       VSVSQTS-KLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 239
SEQ ID NO:3       VSVSQTS-KLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 193
SEQ ID NO:4       VSVSQTS-KLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 239
SEQ ID NO:267     VSVSQTS-KLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 193
SEQ ID NO:366     VSVSQTS-KLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 193
SEQ ID NO:360     VSVSQTS-KLTRAETVFPDVDFVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 193
SEQ ID NO:406     VSVSQTS-KLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 193
SEQ ID NO:346     VSVSQTS-KLTRAETVFPDVDFVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 193
SEQ ID NO:172     VSVSQTS-KLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 193
SEQ ID NO:347     VSVSQTS-KLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 193
SEQ ID NO:365     VSVSQTS-KLTRAETVFPDVDFVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 193
7,700,734         VSVSQTS-KLTRAEAVFPDVDYVNPTEAETILDNITQGTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 239
7,125,841         VSVSQTS-TLTRAETVFPDVEYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFP 239
SEQ ID NO:5       VSVSHISKKLTRAETIFSNTNYENSSEAEIIWDNVTQSNQSFDEFSRVVGGEDAERGQFP 194
SEQ ID NO:14      ****: *  .*****::*.:.:: *.:*** * **:**..***::*:*********: ****
```

Figura 3

```
SEQ ID NO:20      WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIR- 252
SEQ ID NO:325     WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIR- 298
SEQ ID NO:2       WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIR- 298
SEQ ID NO:3       WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIR- 252
SEQ ID NO:4       WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVDTGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIR- 298
SEQ ID NO:267     WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIR- 252
SEQ ID NO:366     WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIR- 252
SEQ ID NO:360     WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVNITVVAGEHNIEETEHTEQNRSVIR- 252
SEQ ID NO:406     WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVNITVVAGEHNIEETEHTEQNRSVIR- 252
SEQ ID NO:346     WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIR- 252
SEQ ID NO:172     WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIR- 252
SEQ ID NO:347     WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIR- 252
SEQ ID NO:365     WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVSR- 252
7,700,734         WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIR- 252
7,125,841         WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIRA 299
SEQ ID NO:5       WQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWVVTAAHCVETDAKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIR- 298
SEQ ID NO:14      WQVLLHGEIAAFCGGSIVNEKWVVTAAHCIKPGVKITVVAGEHNTEKPEPTEQKRNVIR- 253
                  ***:*:*::  ********************:....:********** *:.* ***:*.* *

SEQ ID NO:20      IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 312
SEQ ID NO:325     IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 358
SEQ ID NO:2       IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 358
SEQ ID NO:3       IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 312
SEQ ID NO:4       IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 358
SEQ ID NO:267     IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 312
SEQ ID NO:366     IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 312
SEQ ID NO:360     IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 312
SEQ ID NO:406     IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 312
SEQ ID NO:346     IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 312
SEQ ID NO:172     IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 312
SEQ ID NO:347     IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 312
SEQ ID NO:365     IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 312
7,700,734         IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDAPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 312
7,125,841         IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWAR 359
SEQ ID NO:5       IIPHHNYNATINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR 358
SEQ ID NO:14      AIPYHSYNASINKYSHDIALLELDEPLELNSYVTPICIADRDYTNIFSKFGYGYVSGWGK 313
                    **:*.***:****.********* ** ********************:****** *** ******.:
```

Figura 3

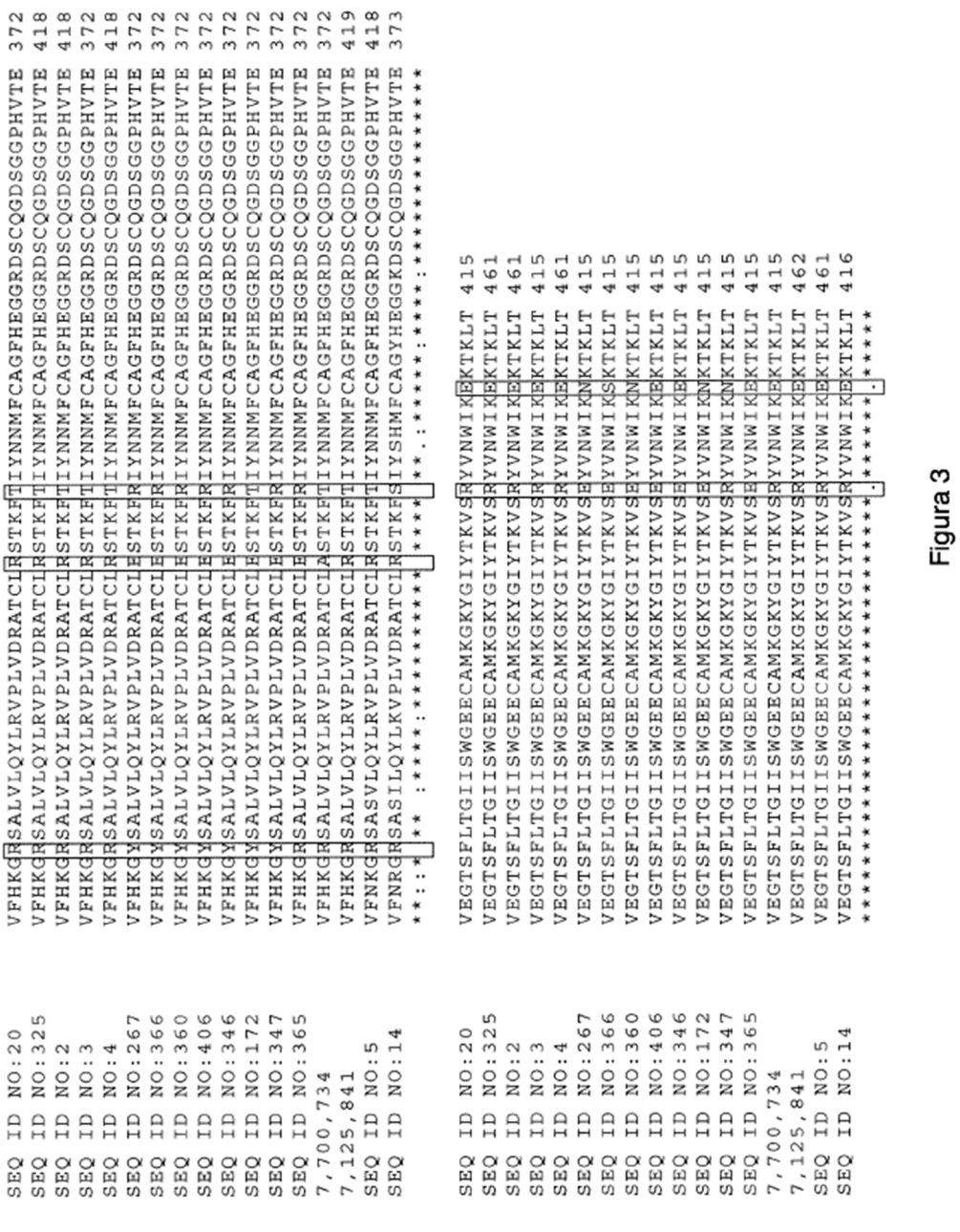

SEQ ID NO:20 VFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 372
SEQ ID NO:325 VFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCIRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 418
SEQ ID NO:2 VFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCIRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 418
SEQ ID NO:3 VFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 372
SEQ ID NO:4 VFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 418
SEQ ID NO:267 VFHKGYSALVLQYLRVPLVDRATCLESTKFRIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 372
SEQ ID NO:366 VFHKGYSALVLQYLRVPLVDRATCLESTKFRIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 372
SEQ ID NO:360 VFHKGYSALVLQYLRVPLVDRATCLESTKFRIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 372
SEQ ID NO:406 VFHKGYSALVLQYLRVPLVDRATCLESTKFRIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 372
SEQ ID NO:346 VFHKGYSALVLQYLRVPLVDRATCLESTKFRIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 372
SEQ ID NO:172 VFHKGYSALVLQYLRVPLVDRATCLESTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 372
SEQ ID NO:347 VFHKGYSALVLQYLRVPLVDRATCLESTKFRIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 372
SEQ ID NO:365 VFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLESTKFRIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 372
7,700,734 VFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLASTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 372
7,125,841 VFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 419
SEQ ID NO:5 VFNKGRSASVLQYLRVPLVDRATCIRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE 418
SEQ ID NO:14 VFNRGRSASILQYLKVPLVDRATCLRSTKFSIYSHMFCAGYHEGGKDSCQGDSGGPHVTE 373
SEQ ID NO:20 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT 415
SEQ ID NO:325 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT 461
SEQ ID NO:2 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT 461
SEQ ID NO:3 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT 415
SEQ ID NO:4 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT 461
SEQ ID NO:267 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSEYVNWIKNKTKLT 415
SEQ ID NO:366 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSEYVNWIKSKTKLT 415
SEQ ID NO:360 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSEYVNWIKNKTKLT 415
SEQ ID NO:406 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSEYVNWIKEKTKLT 415
SEQ ID NO:346 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSEYVNWIKEKTKLT 415
SEQ ID NO:172 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSEYVNWIKNKTKLT 415
SEQ ID NO:347 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKNKTKLT 415
SEQ ID NO:365 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSEYVNWIKEKTKLT 415
7,700,734 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT 415
7,125,841 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT 462
SEQ ID NO:5 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT 461
SEQ ID NO:14 VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT 416

Figura 3