

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 586**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06700410 .1**
96 Fecha de presentación: **02.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1836223**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2007**

54 Título: **MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DE UN ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA UNA ESTRUCTURA TIPO HEMOPEXINA QUE SE UNE DE FORMA ESPECÍFICA A UNA MOLÉCULA DIANA PREDETERMINADA.**

30 Prioridad:
03.01.2005 EP 05000013

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.03.2012

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**LANZENDOERFER, Martin y
SCHRAEML, Michael**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 376 586 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de identificación de un ácido nucleico que codifica una estructura tipo hemopexina que se une de forma específica a una molécula diana predeterminada

La presente invención se refiere a un método para la identificación de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que posee propiedades de unión específica a una molécula diana predeterminada que no son inherentes de forma natural a dicho polipéptido. También se describe un proceso para la optimización de la especificidad de unión y un proceso de producción. La invención da a conocer además un método para la identificación y modificación de posiciones de aminoácido alterables dentro de un andamiaje polipeptídico.

Antecedentes tecnológicos

En los últimos años, el número de solicitudes de patente y publicaciones relacionadas con reactivos de afinidad ha aumentado de forma constante. La mayoría de las mismas está en relación con anticuerpos, es decir inmunoglobulinas monoclonales o policlonales. Solamente una pequeña parte se refiere a alternativas posibles. Una de estas es la utilización de andamiajes de proteínas. Este concepto requiere una arquitectura proteica estable que tolere múltiples sustituciones o inserciones a nivel de su estructura primaria (Nygren, P-A., Skerra, A., J. Immun. Meth. 290 (2004) 3-28).

Los andamiajes de proteínas modificados pueden superar los problemas existentes y extender el área de aplicación de los reactivos de afinidad. Un problema entre muchos otros es la aplicación intracelular de anticuerpos. El obstáculo de esta tecnología de bloqueo de proteínas es que no todos los anticuerpos expresados dentro de las células funcionan bien. Este problema se denomina "problema del enlace disulfuro". Para superar este problema deben realizarse experimentos que requieren mucho tiempo para optimizar un listado complejo de parámetros (Visintin, M., y otros, J. Immun. Meth. 290 (2004) 135-153).

En este sentido, las proteínas poseen diversas ventajas. Entre ellas están su bajo peso molecular, la facilidad de producción por microorganismos, la simplicidad para ser modificadas y una aplicabilidad amplia. En este contexto se han descrito diversos andamiajes de proteínas, por ejemplo las proteínas dedos de zinc para el reconocimiento del ADN (Segal, D.J., y otros, Biochem. 42 (2003) 2137-2148); aptámeros a base de tioredoxina modificados mediante la introducción de secuencias de polipéptidos variables en el bucle del centro activo (Klevenz, B., y otros Cell. Mol. Life Sci. 59 (2002) 1993-1998); la proteína A como andamiaje "aficuerpo" (Sandström K y otros, Prot. Eng. 16 (2003) 691-697; Andersson, M., y otros., J. Immun. Meth. 283 (2003) 225-234); moléculas ARNm-proteína del décimo dominio de fibronectina de tipo III (Xu, L., y otros, Chem. Biol. 9 (2002) 933-942) o moléculas de unión basadas en el inhibidor de la alfa-amilasa (McConnell, S.J., y Hoess, R.H., J. Mol. Biol. 250 (1995) 460-470).

Dos criterios caracterizan de forma substancial un andamiaje de proteínas aplicable. En primer lugar, la proteína debe pertenecer a una familia que posea un núcleo hidrofóbico bien definido. Es beneficioso que exista una relación estrecha entre los miembros de la familia (Skerra, A., J. Mol. Recognit. 13 (2000) 167-187). En segundo lugar, la proteína debe poseer un centro activo o lugar de unión accesible separado espacialmente y funcionalmente independiente. Éste no debe contribuir a la estabilidad intrínseca del núcleo (Predki, P.F., y otros, Nature Struct. Biol. 3 (1996) 54-58). De forma ideal, esta familia de proteínas está involucrada inherentemente en el reconocimiento de múltiples dianas no relacionadas entre sí.

Tal como se describe en Nygren, P-A., y Skerra, A., J. Immun. Meth. 290 (2004) 3-28 se han utilizado diversos andamiajes de proteínas para el desarrollo de proteínas de afinidad novedosas. Estos andamiajes pueden dividirse en tres grupos: (i) bucles de peptídicos únicos, (ii) interfaces de ingeniería y (iii) bucles hipervariables no contiguos.

Con los andamiajes del primer grupo o bien se diversifican aminoácidos individuales en un bucle expuesto o se insertan secuencias de polipéptidos pequeñas en dicho bucle expuesto (ver por ejemplo, Roberts, B.L., y otros, PNAS 89 (1992) 2429-2433 y Gene 121 (1992) 9-16; Röttgen P., y Collins, J., Gene 164 (1995) 243; Lu, Z., y otros, Bio/Technology 13 (1995) 366-372). Una desventaja de este enfoque es que es difícil lograr afinidad, si es que se consigue alguna, frente a una diana completamente nueva (Klevenz, B., y otros, Cell. Mol. Life Sci. 59 (2002) 1993-1998). Puede modificarse la afinidad de unión intrínseca frente a dianas naturales o dianas altamente relacionadas con éstas, pero difícilmente puede cambiarse la diana o la clase de dianas. Otra desventaja es que en el caso de la inserción de pequeños polipéptidos aleatorizados, debe conocerse la diana y estas secuencias deben generarse previamente sobre la base del conocimiento ya establecido.

Pertenecen a los andamiajes del segundo grupo, por ejemplo, el dominio de unión a inmunoglobulinas de la proteína A estafilocócica (por ejemplo Sandström K., y otros, Prot. Eng. 16 (2003) 691-697), el dominio de unión a celulosa C-terminal de la celobiohidrolasa I del hongo *T. reesei* (Smith, G.P., y otros, J. Mol. Biol. 277 (1998) 317-322) y las cristalinas gamma (Fiedler, U., y Rudolph, R., WO 01/04144).

La tercera clase está representada por las propias inmunoglobulinas y por el escasamente relacionado dominio de fibronectina tipo III, así como algunas clases de neurotoxinas.

Además de la idoneidad como andamiaje para la generación de características de unión específicas para moléculas diana predeterminadas, deben tenerse en cuenta las condiciones de aplicación. Entre otras cosas deben tenerse en cuenta especialmente la estabilidad, la selectividad, la solubilidad y la producción funcional del polipéptido de afinidad. Como ejemplo, ya mencionado anteriormente, el obstáculo de la tecnología de bloqueo de proteínas es que no todos los anticuerpos expresados como moléculas de afinidad dentro de las células se producen de forma funcional ("problema del enlace disulfuro", Visintin, M., y otros, J. Immun. Meth. 290 (2004) 135-153).

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es superar estos inconvenientes dando a conocer un andamiaje de polipéptidos alternativo con propiedades de unión específicas frente a una molécula diana predeterminada que no son inherentes de forma natural a dicho polipéptido. Ello comprende la aleatorización de aminoácidos, la optimización de las características de unión y un método de producción del polipéptido optimizado con propiedades de unión específicas.

La patente WO 02/088171 da a conocer métodos para la identificación de dominios de unión con propiedades deseadas mediante el cribado combinatorio de bibliotecas.

Resumen de la invención

La molécula diana predeterminada comprende un miembro de uno de los grupos siguientes: proteínas hedgehog, proteínas morfogénicas óseas, factores de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, G-CSF, interleuquinas e interferones.

La presente invención da a conocer un método de identificación de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une de forma específica a una molécula diana de una biblioteca de ADN, comprendiendo dicho método las etapas de

- a) seleccionar la secuencia del identificador de secuencia nº 2;
- b) preparar una biblioteca de ADN de la secuencia seleccionada en la cual se altera al menos una posición de aminoácido según la tabla V;
- c) realizar un cribado de la biblioteca de ADN preparada para detectar los polipéptidos codificados que se unen de forma específica a una molécula diana predeterminada;
- d) seleccionar el ácido nucleico que codifica un péptido con capacidad de unión específico identificado en la etapa c);
- e) repetir las etapas b) a d) entre dos y cinco veces; y
- f) aislar dicha molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une de forma específica a una molécula diana predeterminada.

En otra realización, el método para la identificación de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une de forma específica a una molécula diana de una biblioteca de ADN, comprende elementos de expresión lineales.

En otra realización, la biblioteca del polipéptido se expresa mediante técnicas de presentación (display) ribosomal.

En otra realización, la biblioteca del polipéptido se expresa mediante técnicas de presentación (display) en bacteriófagos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención da a conocer un método para la identificación de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une de forma específica a una diana predeterminada a partir de una biblioteca de ADN, tal como se define en la reivindicación 1, y describe un método para la determinación de posiciones de aminoácido alterables en un polipéptido.

El polipéptido puede definirse por su secuencia de aminoácidos y por la secuencia de ADN derivada de la misma.

La utilización de técnicas de ADN recombinante permite la producción de numerosos derivados del polipéptido. Dichos derivados pueden, por ejemplo, modificarse en una o varias posiciones de aminoácidos mediante sustitución, alteración o intercambio. La derivatización puede realizarse, por ejemplo, mediante mutagénesis de centros específicos. Dichas variaciones pueden ser realizadas sin dificultad por un experto en la técnica (Sambrook, J., y otros, Molecular Cloning: A laboratory manual ("Clonación molecular; Manual de laboratorio") (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU.; Hames, B.D., y Higgins, S.G., Nucleic acid hybridization - a practical approach ("Hibridación de ácidos nucleicos - un enfoque práctico") (1985) IRL Press, Oxford, Inglaterra).

Para la expresión en células huésped eucariotas o procariotas, el ácido nucleico, que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido, se integra dentro de vectores de expresión adecuados, según métodos conocidos por los expertos en la técnica. Dicho vector de expresión contiene preferentemente un promotor inducible o regulable. A

continuación, estos vectores recombinantes se introducen para ser expresados en células huésped adecuadas, tales como, por ejemplo, *E. coli* como célula huésped procarionta o *Saccharomyces cerevisiae*, células de insecto o célula CHO como células huésped eucariotas, y las células huésped transformadas o transducidas se cultivan bajo condiciones que permiten la expresión del gen heterólogo.

5 El polipéptido puede aislarse y purificarse tras la producción recombinante mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad, utilizando técnicas de purificación de proteínas conocidas, incluyendo la inmunoprecipitación, la filtración en gel, la cromatografía de intercambio iónico, el cromatoenfoco, el enfoque isoeléctrico, la precipitación selectiva, la electroforesis y similares (ver, por ejemplo, Ausubel, I., y Frederick, M., *Curr. Prot. Mol. Biol.* (1992) John Wiley and Sons Nueva York; Sambrook, J., y otros, *Molecular Cloning: A laboratory manual* ("Clonación molecular; Manual de laboratorio") (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU.; Hames, B.D., y Higgins, S.G., *Nucleic acid hybridization - a practical approach* ("Hibridación de ácidos nucleicos – un enfoque práctico") (1985).

15 En la presente invención se utilizan las siguientes abreviaturas y definiciones.

Un "polipéptido" es un polímero de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, ya sea producido de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos pueden denominarse como "péptidos"; los polipéptidos de más de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos pueden denominarse "proteínas".

20 El término "dominio tipo hemopexina" (PEX) significa un polipéptido que muestra homología en secuencia y estructura a la proteína sanguínea hemopexina. Este dominio posee una secuencia media de aproximadamente 200 aminoácidos y está formado por cuatro subdominios que se repiten.

25 La abreviatura "PEX2" significa el dominio C-terminal de la metaloproteínasa de matriz 2 humana, que comprende las posiciones de aminoácido 466 a 660 de la proteína completa.

30 El término "secuencia de consenso" significa una secuencia deducida, ya sea de nucleótidos o aminoácidos. Esta secuencia representa una serie de secuencias similares. Cada posición en la secuencia de consenso corresponde a la base o aminoácido más frecuente en dicha posición que se determina por la alineación de tres o más secuencias.

35 El término "alterar" significa un proceso en el cual se modifica una posición definida en una secuencia, ya sea de ácidos nucleicos o aminoácidos. Este proceso comprende la sustitución de un aminoácido o ácido nucleico (nucleótido) por un aminoácido o ácido nucleico (nucleótido) diferente así como la delección o la inserción.

40 La expresión "polipéptido que se une a una molécula" significa un polipéptido que posee la capacidad de unirse a una molécula diana. El término "se une de forma específica" significa una actividad de unión con una constante de afinidad superior a 10^7 (10⁷) litros/mol.

45 La expresión "molécula diana predeterminada" significa una molécula que es un miembro de los grupos de proteínas siguientes, proteínas hedgehog, proteínas morfogénicas óseas, factores de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, G-CSF, interleuquinas e interferones, inmunoglobulinas, enzimas, inhibidores, activadores y proteínas de la superficie celular.

El término "vector de expresión" o "vector" significa una secuencia de ADN natural o artificial que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos de un polipéptido, una secuencia promotor, una secuencia de finalizador, un marcador de selección y un origen de replicación.

50 El término "molécula de ácido nucleico" o "ácido nucleico" significa una molécula de polinucleótido que puede ser, por ejemplo, ADN, ARN o derivados de los mismos. Debido a la degeneración del código genético, secuencias de ácidos nucleicos diferentes codifican el mismo polipéptido. Estas variaciones también se incluyen.

55 El término "aminoácido" significa alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gli, 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).

60 El término "valor de diversidad de aminoácidos" significa el número de aminoácidos diferentes presentes en una posición específica de una secuencia de aminoácidos. Este valor se determina mediante la alineación de secuencias de un conjunto de secuencias de polipéptidos homólogos en estructura y/o función obtenidas del mismo y/o de diferentes organismos con respecto a una secuencia de consenso o referencia e identificando el número total de aminoácidos diferentes presentes en todas las secuencias alineadas en una posición específica.

65 El término "alineación" significa el proceso de alinear dos o más secuencias para conseguir los niveles máximos de identidad y conservación. Comprende la determinación de la homología de posiciones de secuencias moleculares, lo

que supone la yuxtaposición de aminoácidos o nucleótidos de moléculas homólogas. Como resultado, las secuencias comparadas se presentan en forma que se muestran las regiones de mayor similitud estadística. Durante este proceso puede hallarse que algunas secuencias no contienen todas las posiciones de otras alineadas, es decir, es posible que haya secuencias que contengan una o más deleciones. Para conseguir los niveles máximos de identidad y conservación pueden introducirse huecos en estas secuencias. Los huecos se indican con guiones en la ilustración de la alineación.

Los términos “PCR de superposición-extensión-empalme” (OEL-PCR) y “elemento de expresión lineal” (LEE) significan un método para empalmar fragmentos de ADN y describen los fragmentos de ADN lineal utilizados en y obtenidos mediante este método (ver, por ejemplo, Ho, S.N., y otros, *Gene* 77 (1989) 51-59; Kain, K.C., y otros, *Biotechniques* 10 (1991) 366-374; Shuldiner, A.R., y otros, *Anal. Biochem.* 194 (1991) 9-15). Se segmenta un transcrito de un gen en los módulos “módulo promotor”, “módulo gen” y “módulo finalizador”. El módulo promotor codifica la secuencia del promotor de la transcripción del fago T7, una secuencia de control de la traducción (RBS = sitio de unión ribosómico) y la secuencia del potenciador del fago T7 (g10 épsilon) (Lee, S.S., y Kang, C., *Kor. Biochem. J.* 24 (1991) 673-679). Estas secuencias reguladoras permiten una transcripción y traducción acopladas en un sistema de traducción rápido, por ejemplo RTS 100 E.coli HY System de Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania. El módulo finalizador codifica un códon de parada de la traducción y una secuencia de finalización palindrómica (T7T) del fago T7. Opcionalmente, estos módulos comprenden secuencias de ADN que codifican polipéptidos que pueden utilizarse en procedimientos subsiguientes de marcaje o purificación por afinidad. Los elementos de expresión lineal (Sykes, K.F., y Johnston, S.A., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 355-359) se unieron a estos módulos mediante una PCR de dos etapas. En una primera PCR estándar utilizando la ADN polimerasa de *Pyrococcus woessii* (PWO-PCR) se amplifica un marco de lectura abierto sin intrones, es decir un módulo gen, mediante oligonucleótidos cebadores que flanqueadores específicos de secuencia, lo cual introduce secuencias complementarias que se superponen a los módulos promotor y finalizador. El empalme mediante PCR de estos fragmentos de ADN requiere una energía de hibridación libre de las secuencias complementarias, que debe ser inferior a una delta G de -25 kcal/mol. Ello se consigue mediante extensiones de secuencia que poseen una longitud media de 25 bp. Los oligonucleótidos cebadores se diseñan de manera que se hibridan con el molde del gen a una temperatura entre 48°C y 55°C. Ello refuerza la utilización de oligonucleótidos con una longitud media de entre 45 bp y 55 bp. Tras 30 ciclos de PCR se amplifica la mezcla de PCR conteniendo aproximadamente 50 ng de ADN del módulo gen alargado a una segunda mezcla de PCR. Esta PCR se suministra con entre 50 y 100 ng de los módulos de ADN promotor y finalizador correspondientes y con cebadores terminales específicos de secuencia. En presencia de ADN polimerasa se alargan enzimáticamente los extremos 3' de los fragmentos de ADN complementario hibridados (Barik, S., *Meth. Mol. Biol.* 192 (2002) 185-196) obteniéndose un transcrito de ADN de longitud completa que comprende los tres módulos.

El término “microorganismo” se refiere a microorganismos procariotas y eucariotas. El “microorganismo” se selecciona preferentemente del grupo formado por cepas de *E. coli*, cepas de *Bacillus subtilis*, cepas de *Klebsiella*, cepas de *Salmonella*, cepas de *Pseudomonas* o cepas de *Streptomyces* y cepas de levaduras. Por ejemplo, las cepas de *E. coli* comprenden *E.coli*-K12, UT5600, HB101, XL1, X1776, W3110; las cepas de levaduras comprenden, por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* y *Schizosaccharomyces*.

Dos criterios caracterizan substancialmente un andamiaje de proteínas aplicable. En primer lugar, la proteína debe pertenecer a una familia que muestre un núcleo hidrofóbico bien definido. Es beneficioso que exista una relación estrecha entre los miembros de la familia (Skerra, A., *J. Mol. Recognit.* 13 (2000) 167-187). En segundo lugar, la proteína debe poseer un centro activo o lugar de unión accesible separado espacialmente y funcionalmente independiente. Éste no debe contribuir a la estabilidad intrínseca del núcleo (Predki, P.F., y otros, *Nature Struct. Biol.* 3 (1996) 54-58). De forma ideal, esta familia de proteínas está involucrada inherentemente en el reconocimiento de diversas dianas no relacionadas entre sí.

El andamiaje de proteínas tipo hemopexina (PEX) cumple estos criterios. Este grupo estructural se halla presente en diversas proteínas y familias de proteínas diferentes, por ejemplo la hemopexina (Altruda, F. y otros, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 3841-3859), la vitronectina (Jenne, D., y Stanley, K.K., *Biochemistry* 26 (1987) 6735-6742) o la albúmina 2 de la semilla de guisante (Jenne, D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176 (1991) 1000-1006).

El análisis de la estructura cristalina de las proteínas que contienen grupos tipo hemopexina muestra que este grupo adopta una topología de hélice beta de 4 láminas (Li, J., y otros, *Structure* 3 (1995) 541-549; Faber, H.R., y otros, *Structure* 3 (1995) 551-559). Cada una de las láminas está compuesta de cuatro hojas beta en orientación anti-paralela. Conjuntamente forman una cavidad en el centro de la molécula. Las cuatro láminas están unidas entre sí a través de bucles desde la cuarta hebra beta más externa de la lámina precedente a la primera hebra beta más interna de la lámina siguiente. Un enlace disulfuro conecta los extremos terminales de la estructura, es decir la lámina 4 y la lámina 1.

El andamiaje PEX está involucrado en interacciones proteína-proteína y proteína-ligando diferentes pero bastante específicas. Por lo tanto, la estructura tipo hemopexina forma un marco versátil para el reconocimiento molecular (Bode, W., *Structure* 3 (1995) 527-530). Por ejemplo, se conocen sitios de unión para iones como el calcio, el sodio y el cloro (Libson, A.M., y otros, *Nat. Struct. Biol.* 2 (1995) 938-942; Gohlke, U., y otros, *FEBS Lett.* 378 (1996) 126-

130), así como para la interacción con la fibronectina, TIMP-1/2 (inactivador tisular de las metaloproteinasas de matriz humanas $\frac{1}{2}$), integrinas y heparina (Wallon, U.M., y Overall, C.M., J. Biol. Chem. 272 (1997) 7473-7481; Willenbrock, F., y otros, Biochemistry 32 (1993) 4330-4337; Brooks, P.C., y otros, Cell 92 (1998) 391-400; Bode, W., Structure 3 (1995) 527-530).

5 El dominio de proteína tipo hemopexina ofrece una elevada homología estructural entre los miembros de su familia de proteínas. Se ha notificado, por ejemplo una elevada equivalencia estructural de los dominios hemopexina de, por ejemplo, las metaloproteinasas de matriz 1, 2 y 13 (Gomis-Ruth, F.X., y otros, J. Mol. Biol. 264 (1996) 556-566). Las interacciones predominantemente hidrofóbicas entre las hojas beta adyacentes y orientadas perpendicularmente proporcionan la mayor parte de la estabilidad estructural necesaria (Gomis-Ruth, F.X., y otros, J. Mol. Biol. 264 (1996) 556-566; Fulop, V., y Jones, D.T., Curr. Opin. Struct. Biol. 9 (1999) 715-721.

15 Recientemente se han utilizado bases de datos de proteínas como SMART (Schultz, J., y otros, PNAS 95 (1998) 5857-5864; Letunic, I., y otros, Nuc. Acids Res. 30 (2002) 242-244) para comparar las secuencias homólogas y los plegamientos proteicos para identificar posiciones de aminoácido no conservadas, y por lo tanto teóricamente alterables, es decir aleatorizables, en marcos de proteínas adecuados (Binz, H.K., y otros, J. Mol. Biol. 332 (2003) 489-503; Forrer, P., y otros, ChemBioChem 5 (2004) 183-189).

20 Para identificar posiciones de aminoácido potencialmente alterables, es decir aleatorizables, en el plegamiento PEX, se realizó un enfoque similar utilizando la base de datos SMART. Se identificaron en el dominio PEX posiciones de aminoácido que son aleatorizables sin afectar la estructura, la conformación funcional y la estabilidad de las proteínas.

25 A partir de la base de datos SMART se alinearon 60 dominios PEX, enumerados en la tabla I siguiente, de diferentes especies con la herramienta de bioinformática Pretty (GCG) utilizando la matriz de puntuación blosum 62

Tabla I: Listado de las 60 proteínas que contienen el dominio PEX

Familia de proteínas	Código del plegamiento PEX en la base de datos PDB	Número en la base de datos swissprot	Identificador de secuencia del dominio de hemopexina tal como se utiliza en la presente invención (identificador de secuencia n°:)
Factor de ensamblado del peroxisoma	PEX2_mouse	P55098	03
	PEX2_rat	P24392	04
matriz	MM01_Bovin	P28053	06
metaloproteinasas 1	MM01_HORSE	Q9XSZ5	07
	MM01_human	P03956	08
	MM01_PIG	P21692	09
Metaloproteinasas de matriz 2	MM02_chick (pollo)	Q90611	02
	MM02_human	P08253	10
	MM02_rabbit	P50757	05
Metaloproteinasas de matriz 3	MM03_human	P08254	11
	MM03_MOUSE	P28862	12
	MM03_RABIT	P28863	13
	MM03_RAT	P03957	14
Metaloproteinasas de matriz 8	MM08_human	P22894	15
	MM08_MOUSE	070138	16
	MM08_RAT	088766	17
Metaloproteinasas de matriz 9	MM09_BOVIN	P52176	18
	MM09_CANFA (canis familiaris, perro)	018733	19
	MM09_human	P14780	20
	MM09_MOUSE	P41245	21
Metaloproteinasas de matriz 10	MM10_human	P09238	22
	MM10_MOUSE	055123	23
Metaloproteinasas de matriz 11	MM11_human	P24347	24
	MM11_MOUSE	Q02853	25
Metaloproteinasas de matriz 12	MM12_human	P39900	26
	MM12_MOUSE	P34960	27
	MM12_RABIT	P79227	28
	MM12_RAT	Q63341	29

Metaloproteinasa de matriz 13	MM13_BOVIN	077656	30
	MM13_HORSE	018927	31
	MM13_human	P45452	32
	MM13_RABIT	062806	33
Metaloproteinasa de matriz 14	MM14_human	P50281	34
	MM14_mouse	P53690	35
	MM14_PIG	Q9XT90	36
	MM14_RABIT	Q95220	37
	MM14_RAT	Q10739	38
Metaloproteinasa de matriz 15	MM15_human	P51511	39
	MM15_MOUSE	054732	40
Metaloproteinasa de matriz 16	MM16_human	P51512	41
	MM16_MOUSE	Q9WTR0	42
	MM16_RAT	035548	43
Metaloproteinasa de matriz 17	MM17_human	Q9ULZ9	44
	MM17_MOUSE	Q9R0S3	45
Metaloproteinasa de matriz 18	MM18_XENLA (Xenopus laevis, rana Africana de uñas)	013065	46
Metaloproteinasa de matriz 19	MM19_human	Q99542	47
	MM19_MOUSE	Q9JHI0	48
Metaloproteinasa de matriz 20	MM20_BOVIN	018767	49
	MM20_human	060882	50
	MM20_MOUSE	P57748	51
	MM20_PIG	P79287	52
Metaloproteinasa de matriz 24	MM24_human	Q9Y5R2	53
	MM24_MOUSE	Q9R0S2	54
	MM24_RAT	Q99PW6	55
Metaloproteinasa de matriz 25	MM25_human	Q9NPA2	56
Metaloproteinasa de matriz 26	MM28_human	Q9H239	57
vitronectina	VTNC_human	P04004	58
	VTNC_MOUSE	P29788	59
	VTNC_PIG	P48819	60
	VTNC_RABIT	P22458	61

(Final de la tabla I)

El dominio tipo hemopexina es solamente una pequeña parte de proteína de longitud completa. En la siguiente tabla se muestra un listado de la ubicación del dominio tipo hemopexina alineado en las proteínas de longitud completa.

proteína	Total de aminoácidos de la secuencia	Dominio tipo hemopexina	
		inicio	final
Identificador de secuencia nº: 02	663	469	663
Identificador de secuencia nº: 03	305	97	280
Identificador de secuencia nº: 04	305	97	280
Identificador de secuencia nº: 05	662	468	662
Identificador de secuencia nº: 06	469	275	469
Identificador de secuencia nº: 07	469	275	469
Identificador de secuencia nº: 08	469	275	469
Identificador de secuencia nº: 09	469	275	469
Identificador de secuencia nº: 10	660	466	660
Identificador de	477	287	477

ES 2 376 586 T3

secuencia nº: 11			
Identificador de secuencia nº: 12	477	287	477
Identificador de secuencia nº: 13	478	288	478
Identificador de secuencia nº: 14	475	285	475
Identificador de secuencia nº: 15	467	276	467
Identificador de secuencia nº: 16	465	276	465
Identificador de secuencia nº: 17	466	277	466
Identificador de secuencia nº: 18	712	518	712
Identificador de secuencia nº: 19	704	510	704
Identificador de secuencia nº: 20	707	513	707
Identificador de secuencia nº: 21	730	531	730
Identificador de secuencia nº: 22	476	286	476
Identificador de secuencia nº: 23	476	286	476
Identificador de secuencia nº: 24	488	291	483
Identificador de secuencia nº: 25	492	295	487
Identificador de secuencia nº: 26	470	279	470
Identificador de secuencia nº: 27	462	272	462
Identificador de secuencia nº: 28	464	274	464
Identificador de secuencia nº: 29	465	275	465
Identificador de secuencia nº: 30	471	281	471
Identificador de secuencia nº: 31	472	282	472
Identificador de secuencia nº: 32	471	281	471
Identificador de secuencia nº: 33	471	281	471
Identificador de secuencia nº: 34	582	316	511
Identificador de secuencia nº: 35	582	316	511
Identificador de secuencia nº: 36	580	314	509
Identificador de secuencia nº: 37	582	316	511
Identificador de secuencia nº: 38	582	316	511
Identificador de secuencia nº: 39	669	367	562
Identificador de secuencia nº: 40	657	365	558
Identificador de secuencia nº: 41	607	340	535
Identificador de secuencia nº: 42	607	340	535
Identificador de	607	340	535

ES 2 376 586 T3

secuencia nº: 43			
Identificador de secuencia nº: 44	606	332	529
Identificador de secuencia nº: 45	578	333	530
Identificador de secuencia nº: 46	467	277	467
Identificador de secuencia nº: 47	508	286	475
Identificador de secuencia nº: 48	527	286	474
Identificador de secuencia nº: 49	481	291	481
Identificador de secuencia nº: 50	483	293	483
Identificador de secuencia nº: 51	482	292	482
Identificador de secuencia nº: 52	483	293	483
Identificador de secuencia nº: 53	645	377	572
Identificador de secuencia nº: 54	618	350	545
Identificador de secuencia nº: 55	618	350	545
Identificador de secuencia nº: 56	562	314	511
Identificador de secuencia nº: 57	520	328	520
Identificador de secuencia nº: 58	478	288	478
Identificador de secuencia nº: 59	478	287	478
Identificador de secuencia nº: 60	459	265	459
Identificador de secuencia nº: 61	475	288	475

Mediante la alineación de los dominios tipo hemopexina enumerados más arriba se ha determinado una secuencia de consenso de 210 posiciones (identificador de secuencia nº 1, identificador de secuencia nº 88).

- 5 Para compilar un valor de diversidad de aminoácidos (“determinación de la variabilidad”; ver tabla III), se determinó el número de aminoácidos diferentes por posición. Los huecos en la secuencia se marcan con un guión (-) (ver tabla IV para el alineamiento de todas las secuencias). Para cada posición de la secuencia de consenso se da el número de aminoácidos diferentes (valor de diversidad de aminoácidos). El número máximo posible es 21 (20 aminoácidos diferentes + 1 hueco). Un valor de diversidad bajo indica una posición altamente conservada. Un valor de diversidad elevado indica flexibilidad en dicha posición.
- 10

Tabla III: Valor de diversidad para cada posición de las 210 posiciones de la secuencia de consenso; para la secuencia de consenso sin huecos ver el identificador de secuencia n:1, para la secuencia de consenso con huecos ver el identificador de secuencia n:88.

Posición de aminoácido en la secuencia de consenso	Valor de diversidad de aminoácidos
1	6
2	11
3	12
4	2
5	5
6	7
7	10
8	10
9	11
10	3
11	4
12	6
13	7
14	4
15	10
16	7
17	4
18	7
19	7
20	2
21	8
22	7
23	7
24	2
25	4

Posición de aminoácido en la secuencia de consenso	Valor de diversidad de aminoácidos
44	11
45	7
46	7
47	9
48	12
49	11
50	3
51	7
52	8
53	3
54	2
55	2
56	2
57	2
58	9
59	11
60	4
61	5
62	3
63	2
64	4
65	4
66	10
67	13
68	11

Posición de aminoácido en la secuencia de consenso	Valor de diversidad de aminoácidos
87	11
88	8
89	9
90	11
81	8
92	8
93	5
94	9
95	12
96	11
97	6
98	9
99	8
100	9
101	4
102	9
103	8
104	13
105	11
106	10
107	11
108	10
109	8
110	7
111	5

Posición de aminoácido en la secuencia de consenso	Valor de diversidad de aminoácidos
130	10
131	6
132	3
133	5
134	5
135	6
136	7
137	14
138	11
139	9
140	13
141	8
142	6
143	8
144	10
145	7
146	4
147	8
148	12
149	8
150	8
151	14
152	10
153	9
154	6

Posición de aminoácido en la secuencia de consenso	Valor de diversidad de aminoácidos
173	6
174	5
175	5
176	8
177	3
178	13
179	13
180	5
181	6
182	7
183	6
184	8
185	10
186	12
187	10
188	12
189	5
190	4
191	1
192	3
193	1
194	1
195	2
196	10
197	8

Posición de aminoácido en la secuencia de consenso	Valor de diversidad de aminoácidos
26	5
27	9
28	7
29	6
30	2
31	7
32	7
33	8
34	5
35	11
36	10
37	12
38	15
39	11
40	11
41	12
42	9
43	6

Posición de aminoácido en la secuencia de consenso	Valor de diversidad de aminoácidos
69	9
70	9
71	12
72	7
73	7
74	4
75	4
76	5
77	3
78	10
79	7
80	8
81	4
82	8
83	9
84	12
85	8
86	13

Posición de aminoácido en la secuencia de consenso	Valor de diversidad de aminoácidos
112	7
113	7
114	9
115	11
116	10
117	13
118	11
119	2
120	1
121	8
122	3
123	9
124	5
125	4
126	4
127	8
128	9
129	12

Posición de aminoácido en la secuencia de consenso	Valor de diversidad de aminoácidos
155	4
156	4
157	12
158	14
159	11
160	10
161	6
162	4
163	7
164	5
165	3
166	10
167	13
168	12
169	10
170	8
171	8
172	8

Posición de aminoácido en la secuencia de consenso	Valor de diversidad de aminoácidos
198	7
199	12
200	9
201	10
202	10
203	8
204	8
205	11
206	5
207	4
208	4
209	9
210	1

(final de la tabla III)

ES 2 376 586 T3

Tabla IV: Tabla de alineación para las secuencias identificador de secuencia nº:2 a identificador de secuencia nº:61

	T									T										
SEQ ID NO:02	P	E	L	C	K	H	D	I	V	F	D	G	V	A	Q	I	R	G	E	-
SEQ ID NO:03	Q	P	P	S	K	N	Q	K	L	L	Y	A	V	C	T	-	I	G	G	R
SEQ ID NO:04	Q	P	P	S	K	N	Q	K	L	L	Y	A	V	C	T	-	I	G	G	R
SEQ ID NO:05	P	E	I	C	T	Q	D	I	V	F	D	G	I	A	Q	I	R	G	E	-
SEQ ID NO:06	P	E	V	C	D	S	K	L	T	F	D	A	I	A	T	I	R	G	E	-
SEQ ID NO:07	P	E	V	C	D	S	K	L	T	F	D	A	I	T	T	I	R	G	E	-
SEQ ID NO:08	P	K	A	C	D	S	K	L	T	F	D	A	I	T	T	I	R	G	E	-
SEQ ID NO:09	P	Q	V	C	D	S	K	L	T	F	D	A	I	T	T	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:10	P	E	I	C	K	Q	D	I	V	F	D	G	I	A	Q	I	R	G	E	-
SEQ ID NO:11	P	A	N	C	D	P	A	L	S	F	D	A	V	S	T	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:12	S	P	M	C	S	S	T	L	F	F	D	A	V	S	T	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:13	P	V	M	C	D	P	D	L	S	F	D	A	I	S	T	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:14	L	P	M	C	S	S	A	L	S	F	D	A	V	S	T	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:15	P	K	P	C	D	P	S	L	T	F	D	A	I	T	T	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:16	P	K	A	C	D	P	H	L	R	F	D	A	T	T	T	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:17	P	T	A	C	D	P	H	L	R	F	D	A	A	T	T	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:18	E	D	V	C	N	V	D	-	I	F	D	A	I	A	E	I	R	N	R	-
SEQ ID NO:19	E	D	I	C	K	V	N	-	I	F	D	A	I	A	E	I	R	N	Y	-
SEQ ID NO:20	D	D	A	C	N	V	N	-	I	F	D	A	I	A	E	I	G	N	Q	-
SEQ ID NO:21	D	N	P	C	N	V	D	-	V	F	D	A	I	A	E	I	Q	G	A	-
SEQ ID NO:22	P	A	K	C	D	P	A	L	S	F	D	A	I	S	T	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:23	P	D	K	C	D	P	A	L	S	F	D	S	V	S	T	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:24	P	D	A	C	E	A	-	-	S	F	D	A	V	S	T	I	R	G	E	-
SEQ ID NO:25	P	D	V	C	E	T	-	-	S	F	D	A	V	S	T	I	R	G	E	-
SEQ ID NO:26	P	A	L	C	D	P	N	L	S	F	D	A	V	T	T	V	G	N	K	-
SEQ ID NO:27	S	T	F	C	H	Q	S	L	S	F	D	A	V	T	T	V	G	E	K	-
SEQ ID NO:28	P	T	A	C	D	H	N	L	K	F	D	A	V	T	T	V	G	N	K	-
SEQ ID NO:29	S	T	V	C	H	Q	S	L	S	F	D	A	V	T	T	V	G	D	K	-
SEQ ID NO:30	P	D	K	C	D	P	S	L	S	L	D	A	I	T	S	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:31	P	D	K	C	D	P	S	L	S	L	D	A	I	T	S	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:32	P	D	K	C	D	P	S	L	S	L	D	A	I	T	S	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:33	P	D	K	C	D	P	S	L	S	L	D	A	I	T	S	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:34	P	N	I	C	D	G	N	-	-	F	D	T	V	A	M	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:35	P	N	I	C	D	G	N	-	-	F	D	T	V	A	M	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:36	P	N	I	C	D	G	N	-	-	F	D	T	V	A	M	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:37	P	K	I	C	D	G	N	-	-	F	D	T	V	A	V	F	R	G	E	-
SEQ ID NO:38	P	N	I	C	D	G	N	-	-	F	D	T	V	A	M	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:39	P	N	I	C	D	G	N	-	-	F	D	T	V	A	M	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:40	-	-	I	C	D	G	N	-	-	F	D	T	V	A	V	L	R	G	E	-
SEQ ID NO:41	P	N	I	C	D	G	N	-	-	F	N	T	L	A	I	L	R	R	E	-
SEQ ID NO:42	P	N	I	C	D	G	N	-	-	F	N	T	L	A	I	L	R	R	E	-
SEQ ID NO:43	P	N	I	C	D	G	N	-	-	F	N	T	L	A	I	L	R	R	E	-
SEQ ID NO:44	P	H	R	C	S	T	H	-	-	F	D	A	V	A	Q	I	R	G	E	-
SEQ ID NO:45	P	H	R	C	T	A	H	-	-	F	D	A	V	A	Q	I	R	G	E	-
SEQ ID NO:46	P	S	R	C	D	P	N	V	V	F	N	A	V	T	T	M	R	G	E	-
SEQ ID NO:47	P	D	P	C	S	S	E	L	D	A	M	M	L	G	-	P	R	G	K	-
SEQ ID NO:48	P	N	P	C	S	G	E	V	D	A	M	V	L	G	-	P	R	G	K	-
SEQ ID NO:49	P	D	L	C	D	S	N	L	S	F	D	A	V	T	M	L	G	K	E	-
SEQ ID NO:50	P	D	L	C	D	S	S	S	S	F	D	A	V	T	M	L	G	K	E	-
SEQ ID NO:51	P	D	L	C	D	S	S	S	S	F	D	A	V	T	M	L	G	K	E	-
SEQ ID NO:52	P	D	I	C	D	S	S	S	S	F	D	A	V	T	M	L	G	K	E	-
SEQ ID NO:53	P	N	I	C	D	G	N	-	-	F	N	T	V	A	L	F	R	G	E	-
SEQ ID NO:54	P	N	I	C	D	G	N	-	-	F	N	T	V	A	L	F	R	G	E	-
SEQ ID NO:55	P	N	I	C	D	G	N	-	-	F	N	T	V	A	L	F	R	G	E	-
SEQ ID NO:56	P	D	R	C	E	G	N	-	-	F	D	A	I	A	N	I	R	G	E	-
SEQ ID NO:57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	D	A	I	T	V	D	R	Q	Q	Q
SEQ ID NO:58	Q	E	E	C	E	G	S	S	V	F	E	H	F	A	M	Q	R	D	-	-
SEQ ID NO:59	Q	E	E	C	E	G	S	S	V	F	E	H	F	A	L	L	Q	R	D	-
SEQ ID NO:60	R	E	E	C	E	G	S	S	V	F	A	H	F	A	L	M	Q	R	D	-
SEQ ID NO:61	Q	E	E	C	E	G	S	S	V	F	E	H	F	A	M	L	H	R	D	-

(continuación tabla IV)

201	G	K	I	S	S	D	W	L	G	210
	K	S	S	F	L	F	Y	F	T	C
	S	S	F	L	L	F	Y	F	T	C
	K	K	A	N	S	-	W	F	N	C
	K	K	A	N	S	-	W	F	N	C
	K	K	A	N	S	-	W	F	N	C
	S	J	K	S	S	D	W	L	G	C
	K	S	N	S	S	-	W	L	N	C
	K	S	N	S	S	-	W	F	N	C
	K	S	N	S	S	-	W	F	N	C
	K	S	N	S	S	-	W	F	N	C
	R	G	N	K	-	-	W	L	N	C
	R	S	N	L	-	-	W	L	N	C
	V	G	Y	V	T	T	L	L	K	C
	V	G	Y	V	T	T	I	L	Q	C
	V	G	Y	V	T	T	I	L	Q	C
	K	S	N	S	-	-	W	L	L	C
	K	S	N	S	-	-	W	L	L	C
	P	R	L	V	G	G	F	F	D	C
	P	R	P	V	G	G	F	F	D	C
	K	S	N	S	-	-	W	F	G	C
	K	S	T	S	-	-	W	F	G	C
	K	S	N	S	-	-	W	F	D	C
	S	S	T	S	-	-	W	F	G	C
	T	T	N	S	-	-	L	L	W	C
	P	A	N	S	-	-	L	L	W	C
	P	T	N	S	-	-	L	L	W	C
	P	K	S	A	L	W	M	G	G	C
	P	K	S	A	L	W	M	G	G	C
	P	K	S	A	L	W	M	G	G	C
	P	K	S	A	L	W	M	G	G	C
	P	K	S	A	L	W	M	G	G	C
	P	K	S	I	L	F	M	G	G	C
	P	K	S	I	L	F	M	G	G	C
	P	R	S	I	L	F	M	G	G	C
	P	R	S	I	L	F	M	G	G	C
	P	Q	S	T	A	W	L	V	V	C
	P	Q	S	T	A	W	L	V	V	C
	R	S	N	S	-	W	L	G	H	C
	P	R	N	I	S	W	M	H	C	C
	P	R	N	T	T	W	M	H	C	C
	K	S	S	S	-	W	I	G	C	C
	K	S	S	S	-	W	I	G	C	C
	K	S	N	S	-	W	I	G	C	C
	P	R	N	I	L	W	M	G	C	C
	P	R	N	I	L	W	M	G	C	C
	P	R	N	I	L	W	M	G	C	C
	P	Q	P	M	G	W	L	D	C	C
	R	W	A	T	E	W	M	G	C	C
	P	R	S	I	A	W	L	G	C	C
	P	R	S	I	A	W	L	G	C	C
	P	R	S	I	A	W	L	G	C	C
	P	R	S	I	A	W	L	G	C	C

(final tabla IV)

5 Este método para la determinación del valor de diversidad es un método para todo uso y es aplicable de forma general y no se limita a una secuencia de aminoácidos, polipéptido, dominio o proteína específicos. Por lo tanto, el procedimiento puede aplicarse de forma similar a otras secuencias para determinar e identificar posiciones de aminoácidos con una elevada variabilidad y que son accesibles para ser alteradas sin ejercer una gran influencia sobre la estabilidad y funcionalidad de la estructura.

10 Con el cálculo de la diversidad de aminoácidos, se han identificado posiciones de aminoácido con un valor de diversidad bajo, es decir, menor de 6. Este valor de diversidad bajo indica una alta conservación como, por ejemplo, el residuo cisteína en la posición nº 4 (ver tabla III), que se halló conservado en 57 de las 60 secuencias analizadas (ver Tabla IV). El residuo cisteína en la posición nº 210 se halló conservado en todas las secuencias tipo hemopexina analizadas. Ello demuestra la excelente aplicabilidad de este enfoque, ya que estos dos residuos cisteína son de gran importancia en el andamiaje. Estos dos residuos forma el enlace disulfuro que es esencial para la formación de la estructura tipo hemopexina al unir la cuarta lámina con la primera lámina del polipéptido.

15 A partir del valor de diversidad de aminoácidos, tal como se compila y enumera en la tabla III pueden identificarse posiciones de aminoácido en la secuencia de consenso con una elevada diversidad/variabilidad. Dado que de la numeración de los aminoácidos de elevada diversidad identificados en la secuencia de consenso no puede obtenerse directamente la numeración de aminoácidos correspondiente en el polipéptido entero, la tabla V enumera
20 la numeración de aminoácido de los aminoácidos de elevada diversidad identificados, es decir aminoácidos alterables, de los polipéptidos de longitud completa de los identificadores de secuencia nº 2 a nº 61.

ES 2 376 586 T3

Tabla V: Listado de las posiciones de aminoácido alterables en cada una de las secuencias identificador de secuencia nº2 a identificador de secuencia nº61. La numeración de las posiciones de cada secuencia coincide con la numeración de aminoácidos de la proteína de longitud completa correspondiente.

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	:02:									
	470	471	475	476	477	484	501	502	503	504
	505	506	507	510	514	515	522	529	530	531
	534	541	547	549	550	553	558	559	566	567
	568	569	570	577	578	579	580	589	590	597
	598	600	604	608	611	612	617	618	619	620
	626	627	628	629	638	639	645	646	647	648
	650	652	654	655	658	663				
IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	:03:									
	98	99	103	104	105	111	128	131	135	136
	145	146	153	159	161	162	165	170	171	179
	180	181	182	183	190	191	192	193	202	203
	210	211	213	217	221	224	225	230	231	232
	233	239	240	241	242	251	252	258	259	260
	261	266	268	270	271	274	279			
IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	:04:									
	98	99	103	104	105	111	128	131	135	136
	145	146	153	159	161	162	165	170	171	179
	180	181	182	183	190	191	192	193	202	203
	210	211	213	217	221	224	225	230	231	232
	233	239	240	241	242	251	252	258	259	260
	261	266	268	270	271	274	279			
IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	:05:									
	469	470	474	475	476	483	500	501	502	503
	504	505	506	509	513	514	521	528	529	530
	533	540	546	548	549	552	557	558	565	566
	567	568	569	576	577	578	579	588	589	596
	597	599	603	607	610	611	616	617	618	619
	625	626	627	628	637	638	644	645	646	647
	649	651	653	654	657	662				

ES 2 376 586 T3

(continuación)

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	:06:										
		276	277	281	282	283	290	307	308	309	310
		311	312	315	319	320	327	334	335	336	339
		346	352	354	355	358	363	364	372	373	374
		375	376	383	384	385	386	395	396	403	404
		406	410	414	417	418	423	424	425	426	432
		433	442	443	449	450	451	452	456	458	460
		461	464	468							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	:07:										
		276	277	281	282	283	290	307	308	309	310
		311	312	315	319	320	327	334	335	336	339
		346	352	354	355	358	363	364	372	373	374
		375	376	383	384	385	386	395	396	403	404
		406	410	414	417	418	423	424	425	426	432
		433	442	443	449	450	451	452	456	458	460
		461	464	468							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	:08:										
		276	277	281	282	283	290	307	308	309	310
		311	312	315	319	320	327	334	335	336	339
		346	352	354	355	358	363	364	372	373	374
		375	376	383	384	385	386	395	396	403	404
		406	410	414	417	418	423	424	425	426	432
		433	442	443	449	450	451	452	456	458	460
		461	464	468							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	:09:										
		276	277	281	282	283	290	307	308	309	310
		311	312	315	319	320	327	334	335	336	339
		346	352	354	355	358	363	364	372	373	374
		375	376	383	384	385	386	395	396	403	404
		406	410	414	417	418	423	424	425	426	432
		433	442	443	449	450	451	452	456	458	460
		461	464	468							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	:10:										
		467	468	472	473	474	481	498	499	500	501
		502	503	504	507	511	512	519	526	527	528
		529	531	538	544	546	547	550	555	556	563
		564	565	566	567	574	575	576	577	578	586
		587	594	595	596	597	601	605	608	609	614
		615	616	617	623	624	625	626	635	636	642
		643	644	645	647	649	651	652	655	660	

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	:11:										
		288	289	293	294	295	302	319	320	321	322
		323	324	327	331	332	339	346	347	348	351
		358	364	366	367	370	375	376	383	384	385
		386	387	394	395	396	397	406	407	414	415

ES 2 376 586 T3

417	421	425	428	429	434	435	436	437	443
444	454	455	461	462	463	464	467	469	471
472	475	479							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :12:

288	289	293	294	295	302	319	320	321	322
323	324	327	331	332	339	346	347	348	351
358	364	366	367	370	375	376	383	384	385
386	387	394	395	396	397	406	407	414	415
417	421	425	428	429	434	435	436	437	443
444	454	455	461	462	463	464	467	469	471
472	475	479							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :13:

289	290	294	295	296	303	320	321	322	323
324	325	328	332	333	340	347	348	349	352
359	365	367	368	371	376	377	384	385	386
387	388	395	396	397	398	407	408	415	416
418	422	426	429	430	435	436	437	438	444
445	455	456	462	463	464	465	468	470	472
473	476	480							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :14:

286	287	291	292	293	300	317	318	319	320
321	322	325	329	330	337	344	345	346	349
356	362	364	365	368	373	374	381	382	383
384	385	392	393	394	395	404	405	412	413
415	419	423	426	427	432	433	434	435	441
442	452	453	459	460	461	462	465	467	469
470	473	477							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :15:

277	278	282	283	284	291	308	309	310	311
312	313	316	320	321	328	335	336	337	340
347	353	355	356	359	364	365	372	373	374
375	376	383	384	394	395	402	403	405	409
413	416	417	422	423	424	425	431	432	441
442	448	449	450	451	453	455	457	458	461
465									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :16:

277	278	282	283	284	291	308	309	310	311
312	313	316	320	321	328	335	336	337	340
347	353	355	356	359	364	365	372	373	374
375	376	383	384	394	395	402	403	405	409
413	416	417	422	423	424	425	431	432	441
442	448	449	450	451	453	455	457	458	461
465									

ES 2 376 586 T3

IDENTIFICADOR
DE SECUENCIA :17:

278	279	283	284	285	292	309	310	311	312
313	314	317	321	322	329	336	337	338	341
348	354	356	357	360	365	366	373	374	375
376	377	384	385	395	396	403	404	406	410
414	417	418	423	424	425	426	432	433	442
443	449	450	451	452	454	456	458	459	462
466									

IDENTIFICADOR
DE SECUENCIA :18:

519	520	524	525	532	550	551	552	553	554
555	556	559	563	564	571	578	579	580	583
590	596	597	598	601	605	606	613	614	615
616	617	624	625	626	635	636	643	644	646
650	654	657	658	663	664	665	666	672	673
674	682	683	689	690	691	692	694	696	698
699	702	707							

IDENTIFICADOR
DE SECUENCIA :19:

511	512	516	517	524	542	543	544	545	546
547	548	551	555	556	563	570	571	572	575
582	588	589	590	593	597	598	605	606	607
608	609	616	617	618	627	628	635	636	638
642	646	649	650	655	656	657	658	664	665
666	674	675	681	682	683	684	686	688	690
691	694	699							

IDENTIFICADOR
DE SECUENCIA :20:

514	515	519	520	527	545	546	547	548	549
550	551	554	558	559	566	573	574	575	578
585	591	592	593	596	600	601	608	609	610
611	612	619	620	621	630	631	638	639	641
645	649	652	653	658	659	660	661	667	668
669	677	678	684	685	686	687	695	698	700
701	704	709							

IDENTIFICADOR
DE SECUENCIA :21:

532	533	537	538	545	563	564	565	566	567
568	569	572	576	577	584	591	592	593	596
603	609	610	611	614	618	619	626	627	628
629	630	637	638	639	648	649	656	657	659
663	667	670	671	676	677	678	679	685	686
687	695	696	702	703	704	705	707	709	711
712	715	720							

IDENTIFICADOR
DE SECUENCIA :22:

ES 2 376 586 T3

287	288	291	294	301	316	317	318	319	320
321	324	328	329	336	343	344	345	348	355
361	363	364	367	372	373	380	381	382	383
384	391	392	393	394	403	404	411	412	414
418	422	425	426	431	432	433	434	440	441
450	451	457	458	459	460	462	464	466	467
470	474								

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :23:

287	288	291	294	301	316	317	318	319	320
321	324	328	329	336	343	344	345	348	355
361	363	364	367	372	373	380	381	382	383
384	391	392	393	394	403	404	411	412	414
418	422	425	426	431	432	433	434	440	441
450	451	457	458	459	460	462	464	466	467
470	474								

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :24:

292	293	296	297	304	322	323	324	325	326
327	330	334	335	342	349	350	351	353	360
366	368	369	372	376	377	384	385	386	387
388	395	396	397	406	407	414	415	417	420
424	427	428	433	434	435	436	442	443	444
445	453	454	460	461	462	463	465	467	469
470	473	478							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :25:

296	297	300	301	308	326	327	328	329	330
331	334	338	339	346	353	354	355	357	364
370	372	373	376	380	381	388	389	390	391
392	399	400	401	410	411	418	419	421	424
428	431	432	437	438	439	440	446	447	448
449	457	458	464	465	466	467	469	471	473
474	477	482							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :26:

280	281	285	286	287	294	311	312	313	314
315	316	319	323	324	331	338	339	340	343
350	356	358	359	362	367	368	375	376	377
378	379	386	387	388	389	398	399	406	407
409	413	417	420	421	426	427	428	429	435
436	437	446	447	453	454	455	456	458	460
462	463	466	470						

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :27:

273	274	278	279	280	287	304	305	306	307
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ES 2 376 586 T3

308	309	312	316	317	324	331	332	333	336
343	349	351	352	355	360	361	368	369	370
371	372	379	380	381	382	391	392	399	400
402	406	410	413	414	419	420	421	422	428
429	438	439	445	446	447	448	450	452	454
455	458	462							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :28:

275	276	280	281	282	289	306	307	308	309
310	311	314	318	319	326	333	334	335	338
345	351	353	354	357	362	363	370	371	372
373	374	381	382	383	384	393	394	401	402
404	408	412	415	416	421	422	423	424	430
431	440	441	447	448	449	450	452	454	456
457	460	464							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :29:

276	277	281	282	283	290	307	308	309	310
311	312	315	319	320	327	334	335	336	339
346	352	354	355	358	363	364	371	372	373
374	375	382	383	384	385	394	395	402	403
405	409	413	416	417	422	423	424	425	431
432	441	442	448	449	450	451	453	455	457
458	461	465							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :30:

282	283	287	288	289	296	313	314	315	316
317	318	321	325	326	333	340	341	342	345
352	358	360	361	364	369	370	377	378	379
380	381	388	389	390	391	400	401	408	409
411	415	419	422	423	428	429	430	431	437
438	447	448	454	455	456	457	459	461	463
464	467	471							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :31:

283	284	288	289	290	297	314	315	316	317
318	319	322	326	327	334	341	342	343	346
353	359	361	362	365	370	371	378	379	380
381	382	389	390	391	392	401	402	409	410
412	416	420	423	424	429	430	431	432	438
439	448	449	455	456	457	458	460	462	464
465	468	472							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :32:

282	283	287	288	289	296	313	314	315	316
317	318	321	325	326	333	340	341	342	345
352	358	360	361	364	369	370	377	378	379

ES 2 376 586 T3

380	381	388	389	390	391	400	401	408	409
411	415	419	422	423	428	429	430	431	437
438	447	448	454	455	456	457	459	461	463
464	467	471							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :33:

282	283	287	288	289	296	313	314	315	316
317	318	321	325	326	333	340	341	342	345
352	358	360	361	364	369	370	377	378	379
380	381	388	389	390	391	400	401	408	409
411	415	419	422	423	428	429	430	431	437
438	447	448	454	455	456	457	459	461	463
464	467	471							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :34:

317	318	322	329	347	348	349	350	351	352
355	359	360	367	374	375	378	385	391	393
394	397	402	403	411	412	413	414	421	422
423	424	433	434	441	442	444	448	452	454
455	460	461	462	463	469	470	471	472	481
482	488	489	490	491	493	495	497	498	501
506									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :35:

317	318	322	329	347	348	349	350	351	352
355	359	360	367	374	375	378	385	391	393
394	397	402	403	411	412	413	414	421	422
423	424	433	434	441	442	444	448	452	454
455	460	461	462	463	469	470	471	472	481
482	488	489	490	491	493	495	497	498	501
506									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :36:

315	316	320	327	345	346	347	348	349	350
353	357	358	365	372	373	376	383	389	391
392	395	400	401	409	410	411	412	419	420
421	422	431	432	439	440	442	446	450	452
453	458	459	460	461	467	468	469	470	479
480	486	487	488	489	491	493	495	496	499
504									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :37:

317	318	322	329	347	348	349	350	351	352
355	359	360	367	374	375	378	385	391	393
394	397	402	403	411	412	413	414	421	422
423	424	433	434	441	442	444	448	452	454
455	460	461	462	463	469	470	471	472	481

ES 2 376 586 T3

482	488	489	490	491	493	495	497	498	501
506									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :38:

317	318	322	329	347	348	349	350	351	352
355	359	360	367	374	375	378	385	391	393
394	397	402	403	411	412	413	414	421	422
423	424	433	434	441	442	444	448	452	454
455	460	461	462	463	469	470	471	472	481
482	488	489	490	491	493	495	497	498	501
506									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :39:

368	369	373	380	398	399	400	401	402	403
406	410	411	418	425	426	429	436	442	444
445	448	453	454	462	463	464	465	472	473
474	475	484	485	492	493	495	499	503	505
506	511	512	513	514	520	521	522	523	532
533	539	540	541	542	544	546	548	549	552
557									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :40:

364	365	369	376	394	395	396	397	398	399
402	406	407	415	422	423	426	433	439	441
442	445	450	451	459	460	461	462	469	470
471	472	481	482	489	490	492	496	500	502
503	508	509	510	511	517	518	519	520	529
530	536	537	538	539	541	543	545	546	549
554									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :41:

341	342	346	353	371	372	373	374	375	376
379	383	384	391	398	399	402	409	415	417
418	421	426	427	435	436	437	438	445	446
447	448	457	458	465	466	468	472	476	478
479	484	485	486	487	493	494	495	496	505
506	512	513	514	515	517	519	521	522	525
530									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :42:

341	342	346	353	371	372	373	374	375	376
379	383	384	391	398	399	402	409	415	417
418	421	426	427	435	436	437	438	445	446
447	448	457	458	465	466	468	472	476	478
479	484	485	486	487	493	494	495	496	505
506	512	513	514	515	517	519	521	522	525
530									

ES 2 376 586 T3

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :43:

341	342	346	353	371	372	373	374	375	376
379	383	384	391	398	399	402	409	415	417
418	421	426	427	435	436	437	438	445	446
447	448	457	458	465	466	468	472	476	478
479	484	485	486	487	493	494	495	496	505
506	512	513	514	515	517	519	521	522	525
530									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :44:

333	334	338	345	363	364	365	366	367	368
369	372	376	377	387	394	395	396	399	406
412	414	415	418	423	424	430	431	432	433
440	441	442	443	452	453	460	461	463	467
471	473	474	479	480	481	482	488	489	490
491	499	500	506	507	508	509	511	513	515
516	519	524							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :45:

334	335	339	346	364	365	366	367	368	369
370	373	377	378	388	395	396	397	400	407
413	415	416	419	424	425	431	432	433	434
441	442	443	444	453	454	461	462	464	468
472	474	475	480	481	482	483	489	490	491
492	500	501	507	508	509	510	512	514	516
517	520	525							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :46:

278	279	283	284	285	292	309	310	311	312
313	314	317	321	322	329	336	337	338	341
348	354	356	357	360	365	366	373	374	375
376	377	384	385	386	387	396	397	404	405
407	411	415	418	419	424	425	426	427	433
434	443	444	450	451	452	453	455	457	459
460	463	467							

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :47:

287	288	292	293	294	300	318	319	320	321
322	324	328	329	336	343	344	345	348	355
361	363	364	367	372	373	375	376	377	378
379	386	387	388	389	398	399	406	407	409
413	417	420	421	426	427	428	429	435	436
437	437	446	447	453	454	455	456	458	460
462	463	466	471						

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :48:

ES 2 376 586 T3

287	288	292	293	294	300	318	319	320	321
322	324	328	329	336	343	344	345	348	355
361	363	364	367	372	373	375	376	377	378
379	386	387	388	389	398	399	406	407	409
413	417	420	421	426	427	428	429	435	436
437	446	447	453	454	455	456	458	460	462
463	466	471							

IDENTIFICADOR :49:
DE SECUENCIA

292	293	297	298	299	306	323	324	325	326
327	328	329	332	336	337	344	351	352	353
356	363	369	371	372	374	379	380	387	388
389	390	391	398	399	400	401	410	411	418
419	421	425	429	432	433	438	439	440	441
447	448	457	458	464	465	466	467	469	471
473	474	477	481						

IDENTIFICADOR :50:
DE SECUENCIA

294	295	299	300	301	308	325	326	327	328
329	330	331	334	338	339	346	353	354	355
358	365	371	373	374	376	381	382	389	390
391	392	393	400	401	402	403	412	413	420
421	423	427	431	434	435	440	441	442	443
449	450	459	460	466	467	468	469	471	473
475	476	479	483						

IDENTIFICADOR :51:
DE SECUENCIA

293	294	298	299	300	307	324	325	326	327
328	329	330	333	337	338	345	352	353	354
357	364	370	372	373	375	380	381	388	389
390	391	392	399	400	401	402	411	412	419
420	422	426	430	433	434	439	440	441	442
448	449	458	459	465	466	467	468	470	472
474	475	478	482						

IDENTIFICADOR :52:
DE SECUENCIA

294	295	299	300	301	308	325	326	327	328
329	330	331	334	338	339	346	353	354	355
358	365	371	373	374	376	381	382	389	390
391	392	393	400	401	402	403	412	413	420
421	423	427	431	434	435	440	441	442	443
449	450	459	460	466	467	468	469	471	473
475	476	479	483						

IDENTIFICADOR :53:
DE SECUENCIA

378	379	383	390	408	409	410	411	412	413
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ES 2 376 586 T3

416	420	421	428	435	436	439	446	452	454
455	458	463	464	472	473	474	475	482	483
484	485	494	495	502	503	505	509	513	515
516	521	522	523	524	530	531	532	533	542
543	549	550	551	552	554	556	558	559	562
567									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :54:

351	352	356	363	381	382	383	384	385	386
389	393	394	401	408	409	412	419	425	427
428	431	436	437	445	446	447	448	455	456
457	458	467	468	475	476	478	482	486	488
489	494	495	496	497	503	504	505	506	515
516	522	523	524	525	527	529	531	532	535
540									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :55:

351	352	356	363	381	382	383	384	385	386
389	393	394	401	408	409	412	419	425	427
428	431	436	437	445	446	447	448	455	456
457	458	467	468	475	476	478	482	486	488
489	494	495	496	497	503	504	505	506	515
516	522	523	524	525	527	529	531	532	535
540									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :56:

315	316	320	327	345	346	347	348	349	350
351	354	358	359	369	376	377	378	381	388
394	396	397	400	404	405	411	412	413	414
415	422	423	424	425	434	435	442	443	445
449	453	455	456	461	462	463	464	470	471
472	473	481	482	488	489	490	491	493	495
497	498	501	506						

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :57:

327	334	353	354	355	356	357	360	364	365
372	379	380	381	384	391	397	399	400	403
408	409	413	414	415	416	417	424	425	426
427	436	437	444	445	447	451	455	457	458
463	464	465	466	472	473	474	483	484	490
491	492	493	495	497	499	500	503	508	

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :58:

291	292	296	297	298	305	323	324	325	326
327	330	334	335	341	345	346	347	350	357
363	365	366	369	374	375	383	384	385	386
387	390	391	392	393	400	407	408	410	414

ES 2 376 586 T3

418	421	422	427	428	429	430	432	439	440
446	447	448	449	453	456	458	459	462	467

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :59:

290	291	295	296	297	304	322	323	324	325
326	329	333	334	340	344	345	346	349	356
362	364	365	368	373	374	382	383	384	385
386	391	392	393	394	401	408	409	411	415
419	422	423	428	429	430	431	433		440
441	447	448	449	450	454	457	459	460	463
468									

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :60:

268	269	273	274	275	282	300	301	302	303
304	307	311	312	318	322	323	324	327	334
340	342	343	346	351	352	360	361	362	363
364	371	372	373	374	381	388	389	391	395
399	402	403	408	409	410	411	413	420	421
427	428	429	430	434	437	439	440	443	448

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA :61:

291	292	296	297	298	305	323	324	325	326
327	330	334	335	341	345	346	347	350	357
362	364	365	368	373	374	380	381	382	383
384	387	388	389	390	397	404	405	407	411
415	418	419	424	425	426	427	429	436	437
443	444	445	446	450	453	455	456	459	464

5 También se han determinado las posiciones con un valor de diversidad elevado, es decir, igual o superior a 8, o incluso 10. Este análisis mostró que éstas están localizadas principalmente en las regiones bucle. Estas regiones muestran una variabilidad elevada, es decir flexibilidad, y como resultado reúnen espacialmente varios aminoácidos presentados a la superficie desde los bucles de conexión de las láminas. Los resultados también sugieren no utilizar la superficie interior del túnel para experimentos de aleatorización. Las tres hojas beta internas de cada lámina también son críticas, porque muestran una conservación elevada y contribuyen a la estabilidad del núcleo de la proteína. Por lo tanto, los aminoácidos presentados a disolventes, que no contribuyen a la estabilidad del núcleo hidrofóbico de la proteína, que muestran un valor de diversidad lo suficientemente elevado, y por lo tanto, un nivel de conservación bajo, son el foco de interés para un enfoque de mutagénesis.

15 Con este método es posible obtener, al mismo tiempo, un listado de posiciones de aminoácido variables, es decir alterables, en y para todas las proteínas que se han utilizado en el alineamiento. Para el dominio tipo hemopexina, tal como se ha ejemplificado anteriormente, se han utilizado los dominios tipo hemopexina de sesenta proteínas y, por lo tanto, se han identificado las posiciones de los aminoácidos alterables, es decir variables, de los sesenta dominios. Estas posiciones se enumeran en la tabla V (la numeración coincide con la del polipéptido/proteína de longitud completa).

20 En la tabla V se enumeran las posiciones de los aminoácidos variables de los sesenta dominios tipo hemopexina (identificador de secuencia nº:02 a identificador de secuencia nº:61). Las posiciones de los aminoácidos se numeran según la secuencia de longitud completa de la proteína que contiene el dominio tipo hemopexina. Por ejemplo, para el dominio tipo hemopexina del identificador de secuencia nº:02 son las posiciones de aminoácidos enumeradas después del sub-apartado identificador de secuencia nº:02 de la tabla V y son, por lo tanto, las posiciones 470, 471, 475, 476, 477, 484, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 510, 514, 515, 522, 529, 530, 531, 534, 541, 547, 549, 550, 553, 558, 559, 566, 567, 568, 569, 570, 577, 578, 579, 580, 589, 590, 597, 598, 600, 604, 608, 611, 612, 617, 618, 619, 620, 626, 627, 628, 629, 638, 639, 645, 646, 647, 648, 650, 652, 654, 655, 658, 663. Las posiciones de

aminoácidos alterables del identificador de secuencia nº:3 al identificador de secuencia nº:61 se enumeran del mismo modo en la tabla V después del sub-apartado correspondiente.

5 Disponiendo de las posiciones de aminoácidos alterables de los identificadores de secuencia nº:01 a 61 cada una de estas secuencias puede tomarse como punto de partida para operaciones adicionales.

10 La producción en sistemas sin células y el análisis de variantes de proteínas generadas racionalmente mediante ingeniería pueden automatizarse, sin embargo, el tamaño de la biblioteca de constructos de proteínas diseñados racionalmente a procesar sigue siendo siempre limitado por el rendimiento técnico de cada sistema. Por lo tanto, el análisis de las propiedades de unión de una gran multitud de productos génicos requiere de esfuerzos adicionales.

15 Existen diversas técnicas para la expresión y cribado de una biblioteca de polipéptidos, tal como, por ejemplo, la presentación en fagos, ribosomas o bacterias (Smith, G.P., *Science* 228 (1985) 1315-1317; Hanes, J., y Pluckthun, A., *PNAS* 94 (1997) 4937-4942; Stahl, S., y Uhlen, M., *TIBTECH* 15 (1997) 185-192).

La presente invención se ejemplificará con la técnica de presentación en ribosomas (ver por ejemplo Hanes, J., y Pluckthun, A., *PNAS* 94 (1997) 4937-4942; Mattheakis, L.C., y otros, *PNAS* 91 (1994) 9022-9026; He, M., y Taussig, M.J., *Nuc. Acids Res.* 25 (1997) 5132-5134), aunque son aplicables otras técnicas.

20 La técnicas de evolución directa son adecuadas para complementar la capacidad técnica de una plataforma de producción de proteínas de alto rendimiento. Basada en una tecnología de síntesis de proteínas en sistemas sin células, la presentación en ribosomas es un método excelente para ser implementado en un proceso de producción y análisis de proteínas de alto rendimiento. El objetivo de la presentación en ribosomas es la generación de complejos ternarios, en los cuales el genotipo, caracterizado por su ARN mensajero (ARNm), se une físicamente a través del ribosoma al fenotipo que codifica, caracterizado por los polipéptidos expresados.

30 Con este propósito, se transcribe y traduce *in vitro* un molde de ADN lineal, que codifica una genoteca. Por debajo de la secuencia del gen se fusiona una secuencia espaciador, en la cual la característica predominante es la ausencia de un codón de finalización de la traducción. Este dominio espaciador facilita la presentación del polipéptido que se está traduciendo y plegando a la vez que se traduce, por lo que permanece unido al ribosoma. Estos complejos se someten a un procedimiento de cribado, en el cual se permite que el polipéptido expuesto en el ribosoma se una a una molécula ligando predeterminada. Se aísla el ARNm de complejos fuertemente unidos, se transcribe de forma inversa y se amplifica mediante PCR. El subclonado de los productos de la PCR en un sistema de vectores y la subsiguiente secuenciación del ADN revela información sobre el genotipo relacionado con el fenotipo del polipéptido unido. Mediante ciclos repetidos de mutagénesis y presentación en ribosomas pueden identificarse proteínas que se unen de bibliotecas de hasta 1.014 miembros (Mattheakis, L.C., y otros, *PNAS* 91 (1994) 9022-9026; Hanes, J., y Pluckthun, A., *PNAS* 94 (1997) 4937-4942; Lamla, T., y Erdmann, V.A., *J. Mol. Biol.* 329 (2003) 381-388).

40 En general, la presentación en ribosomas requiere el estancamiento del ribosoma mientras alcanza el extremo 3' del ARNm sin disociación de las unidades del mismo. Una vez el ribosoma ha encontrado el extremo 3' del ARNm el sitio de entrada (sitio A) del ARN de transferencia (ARNt) del ribosoma queda libre. En procariontas, esta situación da lugar a la activación del mecanismo de rescate del ribosoma, inducido por el ARNtm (ARN de transferencia mensajero; Abo, T., y otros *EMBO J.* 19 (2000) 3762-3769; Hayes, C.S., y Sauer, R.T., *Mol. Cell.* 12 (2003) 903-911; Keiler, K.C., y otros, *Science* 271 (1996) 990-993). Respecto a la selección de la presentación en ribosomas, este mecanismo disminuye la cantidad de complejos ternarios funcionales y el rendimiento de productos de la PCR disminuye significativamente (Hanes, J., y Pluckthun, A., *PNAS* 94 (1997) 4937-4942).

50 Este mecanismo de rescate de ribosomas inducido por el ARNtm puede obviarse, cuando se fuerza a que la maquinaria de traducción del ribosoma se estanque antes de que el ribosoma encuentre el extremo 3' del ARNm. Gracias a la detención de la traducción inducida, el sitio A del ribosoma sigue ocupado. El espaciador de la presentación del constructo de presentación en ribosomas posee una secuencia, según se muestra en el identificador de secuencia nº:62. Con este espaciador, la traducción puede detenerse una vez que se ha traducido el polipéptido completo y antes de que se desencadene el mecanismo de rescate del ribosoma.

55 Esto se ha conseguido eliminando los codones de parada de la traducción (Mattheakis, L.C., y otros, *PNAS* 91 (1994) 9022-9026; Hanes, J., y Pluckthun, A., *PNAS* 94 (1997) 4937-4942) de la secuencia del espaciador del ADN del constructo de presentación en ribosomas. Como consecuencia, se genera un complejo de elevado peso molecular formado por el ARNm, el ribosoma y el polipéptido estancado durante la traducción.

60 Para la generación de bibliotecas existen diversas técnicas conocidas por los expertos. A continuación se expone un procedimiento a modo de ejemplo.

65 Se produjeron como base de una biblioteca de ADN Elementos de Expresión Lineal (LEE) de modo modular. Para proceder rápidamente a la PCR de superposición-extensión-empalme con los fragmentos de ADN aleatorizados, se produjo previamente una biblioteca de módulos de ADN. Para obtener un rendimiento suficiente de producto de la

PCR, fue necesario utilizar cebadores oligonucleótidos purificados mediante HPLC y una ADN polimerasa con una actividad exonucleolítica 3'-5', produciendo fragmentos de ADN de extremos romos (Garrity, P.A., y Wold, B.J., PNAS 89 (1992) 1021-1025).

5 A modo de ejemplo, se fusionaron en diferentes combinaciones de módulos de ADN los genes que codifican las proteínas PEX2 (dominio tipo hemopexina c-terminal de la metaloproteínasa de matriz 2 humana), TIMP2 (inhibidor tisular de la metaloproteínasa de matriz 2 humana), HDAC-I (histona deacetilasa I humana), BirA (holoenzima biotina ligasa de *E. coli*) y GFP (proteína fluorescente verde). Se determinó la concentración de productos de PCR mediante
10 cuantificación densitométrica comparativa utilizando el LUMI Imager System (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania). El rendimiento medio de producto de la PCR de los Elementos de Expresión Lineal obtenidos fue de aproximadamente 60 ng/μl ± 20 ng/μl (ng por μl de mezcla de PCR). Utilizando la ADN polimerasa de *P. woesii* (PWO) fue posible generar LEE de una longitud de hasta 2.000 bp.

15 En un ejemplo comparativo se generó una biblioteca pequeña en la cual se aleatorizaron 8 posiciones de aminoácido del polipéptido PEX2. Con este propósito se escogieron las posiciones siguientes y los aminoácidos correspondientes del listado del identificador de secuencia n°:10, tal como se enumeran en la tabla V: 528 (Gln), 529 (Glu), 550 (Arg), 576 (Lys), 577 (Asn), 578 (Lys), 594 (Val) y 596 (Lys). La biblioteca se generó mediante síntesis por PCR sin moldes, tal como se describe en el ejemplo 2. Se unieron un molde de presentación en ribosomas por
20 ejemplo mediante los módulos T7P-g10epsilon-ATG (identificador de secuencia n°:74), un polipéptido de la biblioteca generada y un separador de la presentación en ribosomas (identificador de secuencia n°:62).

25 Un requisito previo para obtener un andamiaje de proteínas adecuado es que tenga capacidad para plegarse de forma estable en su conformación activa, incluso bajo condiciones en las que soporta la carga de múltiples aminoácidos sustituidos. Esta característica puede examinarse dirigiendo la biblioteca contra parejas de unión proteica conocidas. En un ejemplo, la biblioteca PEX2 se presentó para reconocer al ligando proteico inhibidor tisular de la metaloproteínasa 2 (TIMP2). Los polipéptidos aleatorizados de la biblioteca PEX-2 seguían siendo capaces de reconocer a su pareja de unión inherente TIMP2 en un enfoque de presentación en ribosomas. Ello indica que se mantuvo la estructura-función del andamiaje a pesar de que éste se mutó múltiples veces.

30 Para preparar y optimizar las propiedades de unión de un elemento capaz de unirse de forma específica basado en un andamiaje de polipéptido a una molécula diana predeterminada que no se une inherentemente al andamiaje, debe ejecutarse varias veces un ciclo que comprende cuatro etapas principales. Estas etapas son (i) alteración de al menos una posición de aminoácido según la tabla V, (ii) preparación del constructo de presentación, (iii) presentación y selección de una variante de unión específica y (iv) aislamiento y secuenciación de la variante
35 seleccionada. Generalmente son necesarios entre dos y cinco ciclos para establecer características de unión nuevas en un andamiaje.

40 La molécula diana predeterminada no se limita a un grupo específico de polipéptidos. El polipéptido predeterminado puede pertenecer a uno de los grupos siguientes: proteínas hedgehog, proteínas morfogénicas óseas, factores de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, G-CSF, interleuquinas e interferones, así como a los grupos inmunoglobulinas, enzimas, inhibidores, activadores y proteínas de la superficie celular.

45 En un ejemplo se escogió IGF-I, que no se une a PEX2, como molécula diana predeterminada para la generación de un elemento capaz de unirse específicamente basado en el andamiaje PEX2. La molécula diana se presentó en placa en forma de ligando biotinilado. Tras un segundo ciclo de presentación en ribosomas con la biblioteca PEX2 se retuvo una señal de producto de PCR visible. Ello muestra que la biblioteca es adecuada para la selección de proteínas o polipéptidos que se unen específicamente a una molécula diana predeterminada que no es unida inherentemente por la proteína polipéptido.

50 Los ejemplos, referencias y listados de secuencias siguientes se aportan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo alcance verdadero queda establecido en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

55 Los ejemplos se basan en el identificador de secuencia n°: 10 (no reivindicado).

Ejemplo 1

60 PCR de superposición-extensión-empalme (OEL-PCR)

65 Se unieron modularmente los Elementos de expresión lineal mediante un protocolo de PCR en dos etapas, utilizando el principio de empalme de ADN con superposición. En una PWO-PCR estándar se amplifica un marco de lectura abierto sin intrones con cebadores puente terminales específicos de secuencia, lo que genera secuencias homólogas que se superponen a las secuencias de ADN que las flanquean. Se transfirieron dos μl de la primera mezcla de PCR que contenía aproximadamente 50 ng del fragmento génico que se ha extendido (módulo gen) a una

segunda mezcla de PWO-PCR. La mezcla se suplementó con entre 50 ng y 100 ng de fragmentos de ADN producidos previamente (módulos promotor y finalizador) y los correspondientes cebadores terminales específicos de secuencia todos a una concentración de 1 μ M. Típicamente, esta segunda etapa de PCR comprende 30 ciclos. Los parámetros físicos de los perfiles de PCR se ajustaron según los requisitos de los fragmentos de ADN a los que quería ligarse.

Ejemplo 2

Síntesis de la biblioteca de ADN PEX2

Los codones triplete PEX2 que codifican las coordenadas de los aminoácidos de los dominios tipo hemopexina 64, 65, 86, 112, 113, 114, 130 y 132 (equivalentes a 528 (Gln), 529 (Glu), 550 (Arg), 576 (Lys), 577 (Asn), 578 (Lys), 594 (Val) y 596 (Lys) en la metaloproteínasa de matriz 2) humana completa se aleatorizaron mediante grupos NNK. La secuencia natural humana del ADN PEX2 se dividió en tres secciones de secuencia. Una PWO-PCR estándar suplementada con 10 ng de vector-molde pIVEX2.1MCS PEX2 y los cebadores PEX2forw (identificador de secuencia nº63) y PEXR4 (identificador de secuencia nº64) ambos a una concentración de 1 μ M amplificó el fragmento 1 bp - 218 bp. El fragmento 402 bp - 605 bp se amplificó en una PWO-PCR estándar con 10 ng de vector-molde pIVEX2.1MCS PEX2 y los cebadores PEXF4 (identificador de secuencia nº65) y PEX2rev (identificador de secuencia nº66) ambos a una concentración de 1 μ M. La secuencia 196 bp - 432 bp formó superposiciones con los fragmentos de ADN 1 bp - 218 bp y 402 bp - 605 bp y se sintetizó mediante PCR sin moldes con los cebadores PEXF1 (identificador de secuencia nº67) y PEXR1 (identificador de secuencia nº68) ambos a una concentración de 1 μ M y PEXR3 (identificador de secuencia nº69), PEXR2 (identificador de secuencia nº70) y PEXF2 (identificador de secuencia nº71) todos a una concentración de 0,25 μ M. El perfil de PCR fue el mismo para las tres PCR: TIM (temperatura de fusión inicial): 1 minuto a 94 °C, TM (temperatura de fusión): 20 segundos a 94°C, TA (temperatura de hibridación): 30 segundos a 60°C; TE (temperatura de alargamiento): 15 segundos a 72 °C, 25 ciclos, TFE (temperatura de alargamiento final): 2 minutos a 72°C. La secuencia PEX2 aleatorizada completa (588 bp) se obtuvo aplicando 70 ng de cada uno de los fragmentos de secuencia de ADN a una PWO-PCR estándar con los cebadores puente T7P_PEX2 (identificador de secuencia nº72) y PEX2_RD (identificador de secuencia nº73) ambos a una concentración de 1 μ M. El perfil de PCR fue: TIM: 1 minuto a 94 °C, TM: 20 segundos a 94°C, TA: 30 segundos a 60°C; TE: 60 segundos a 72 °C, 25 ciclos, TFE: 5 minutos a 72°C. Los cebadores puente introdujeron superposiciones de ADN homólogo para el ensamblado de la genoteca PEX2 en un molde de presentación en ribosomas mediante OEL-PCR.

Ejemplo 3

Transcripción y traducción in vitro sin células

Según las instrucciones del fabricante, se transcribieron y tradujeron Elementos de Expresión Lineal en RTS 100 HY *E.coli* System. Se incubaron moldes de ADN lineal (100 ng - 500 ng) a 30°C. Opcionalmente, se añadieron 6 μ l de GroEsupplement (Roche).

Ejemplo 4

Biotinilación específica de sitio de proteínas de fusión

Se modificó el sistema RTS 100 *E.coli* HY System para realizar una biotinilación enzimática específica de sitio. Se unieron sesenta μ l de mezcla RTS, según las instrucciones del fabricante. La mezcla se suplementó con 2 μ l de solución stock de Inhibidor de Proteasas Completo sin EDTA, 2 μ M de d-(+)-biotina, 50 ng del Elemento de Expresión Lineal T7P_BirA_T7T (1405 bp), que codifica la Biotina Ligasa de *E. coli* (BirA, EC 6.3.4.15) y entre 100 ng y 500 ng del molde lineal que codifica la proteína de fusión substrato. La proteína de fusión substrato se fusionó por el extremo N terminal o C terminal a la secuencia Péptido Aceptor de Biotina (BAP). En todos los experimentos se utilizó una variante de 15 elementos de la secuencia #85 identificada por Schatz (Schatz, P.J., Biotechnology (NY) 11 (1993) 1138-1143; Beckett, D. y otros, Protein Sci. 8 (1999) 921-929) (Avitag, Avidity Inc., Denver, Colo. EE.UU). La Biotina Ligasa se co-expresó a partir del molde lineal T7Pg10epsilon_birA_T7T.

Ejemplo 5

a) Protocolo de presentación en ribosomas

Se mantuvieron todos los tampones en hielo. Todos los dispositivos eran estériles y libres de ADNasa y ARNasa. La poyata de trabajo se limpió con Rnase-ZAP.

Tampón de lavado stock (Stock WB) 10x para presentación en ribosomas: TRIS (tris(hidroximetil)-aminometano) 0,5 M, pH 7,5 (4°C) ajustado con AcOH (ácido acético); NaCl 1,5 M; acetato magnésico 0,5 M, almacenamiento a -20°.

ES 2 376 586 T3

Tampón de elución (Stock EB) 10x para presentación en ribosomas: TRIS 0,5 M, pH 7,5 (4°C) ajustado con AcOH; NaCl 1,5 M; 200 mM EDTA, almacenamiento a -20°.

5 10 ml de tampón de lavado para presentación en ribosomas (WB): 1200 µl de Stock WB 10x pH 7,5, TWEEN 20 0,05% (50µl TWEEN 20 al 10 %), BSA 5 % (5 ml de BSA bloqueante al 10%), ARN-t 5 µg/ml, KCl 670 mM (0,5 g KCl) ajustar a 10ml con agua grado PCR.

10 10 ml de tampón de parada para presentación en ribosomas (SB): 1200 µl de Stock WB 10x pH 7,5, TWEEN 20 0,05% (50µl TWEEN 20 al 10 %), BSA 5 % (5 ml de BSA bloqueante al 10%), ARN-t 5 µg/ml, 670 KCl mM (0,5 g KCl), GSSG (glutatión oxidado) 4 mM, cAMP 25 µM (10µl de solución Stock), ajustar a 10ml con agua grado PCR.

15 2 ml de tampón de elución para presentación en ribosomas: 200µl de Stock EB 10x, BSA 0,25 % (50 µl de BSA bloqueante al 10 %), 5.000 unidades A260 de ARN-r ribosomal 16S-23S, ARN-t 5 µg/ml, ajustar a 2ml con agua grado PCR.

Reactivo bloqueante: Tampón BSA al 5% (2,5 ml de BSA bloqueante al 10%), 50% de Tampón Conjugado Universal.

20 Tampón PBS 10x: Na₂HPO₄ 0,1 M; KH₂PO₄ 0,01 M (10x pH 7,0; 1x pH 7,4); NaCl 1,37 M; KCl 27 mM.

b) Preparación de los ectodominios erbB2 y erbB3

25 Los ectodominios de los receptores humanos erbB2 y erbB3 se obtuvieron de R&D Systems como receptores quimera. Los ectodominios de los receptores se fusionaron genéticamente a la proteína humana IgG1FC (fragmento Fc del anticuerpo IgG1 humano). Ambas moléculas mostraron una masa molecular de 96 kDa y contenían un péptido hexahistidina en su extremo C terminal. Como resultado de la glicosilación, el peso molecular de las proteínas aumentó entre 130 y 140 kDa. Las proteínas quiméricas se obtuvieron como proteínas liofilizadas y se volvieron a solubilizar en tampón PBS con BSA al 0,1%. Las proteínas se almacenaron a -80°C hasta el momento de ser utilizadas.

30 c) Recubrimiento de las placas de microtitulación

35 Se lavó tres veces un volumen de reacción (RV) de una placa de microtitulación (MT) con Tampón Conjugado Universal. Se volvieron a disolver dos y medio (2,5) µg de ligando en 100 µl de Reactivo de Bloqueo. Los ligandos biotinilados se inmovilizaron alternativamente en los pocillos de placas MT recubiertas con Estreptavidina y Avidina. Las quimeras erbB2/FC- y erbB3/FC se inmovilizaron alternativamente en los pocillos de placas MT recubiertas con proteína A y proteína G. La solución de ligando se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en la placa MT con agitación a 500 rpm en una plataforma de agitación robótica Biorobot 8000. Para determinar la señal de fondo se cubrió un pocillo con 100 µl de reactivo de bloqueo sin ligando. Se lavaron los pocillos con 3 RV de Reactivo de Bloqueo. El Reactivo de Bloqueo (300 µl) se incubó en cada pocillo durante 1 hora a 4°C y 200 rpm, Antes de aplicar la mezcla de parada de la traducción, se lavaron los pocillos con 3 RV de tampón WB helado.

d) Generación de moldes de presentación en ribosomas

45 Para el procedimiento de presentación en ribosomas estándar se alargó un único gen o una genoteca con cebadores puente específicos. Los fragmentos de ADN alargados se fusionaron mediante OEL-PCR a módulos T7Pg10epsilon (identificador de secuencia n°:74) y a un separador de presentación en ribosomas (identificador de secuencia n°:62) utilizando los cebadores terminales T7Pfor (identificador de secuencia n°:75) y R1A (identificador de secuencia n°:76) 5'-AAATCGAAAGGCCAGTTTTTCG-3'. El perfil de PCR para el ensamblado PCR fue: TIM 1 minuto a 94 °C, TM: 20 segundos a 94°C, TA: 30 segundos a 60°C; TE: 60 segundos por 1.000 bp a 72 °C, 30 ciclos, TFE: 5 minutos a 72°C.

55 Producción del elemento de expresión lineal (LEE) T7PAviTagFXa-PEX2-T7T: Se amplificó el gen PEX2 humano en una PWO-PCR estándar a partir de 10 ng del plásmido molde pDSPEX2 (Roche) utilizando el cebador puente según el identificador de secuencia n°:77 y el identificador de secuencia n°:78. El gen con superposición se fusionó mediante OEL-PCR a los módulos de ADN T7PAviTagFXa (identificador de secuencia n°:79) y T7T (identificador de secuencia n°:80) utilizando los cebadores T7Pfor (identificador de secuencia n°:82) y T7Trev (identificador de secuencia n°:81).

60 e) Preparación de la mezcla de traducción para la presentación en ribosomas.

65 Se preparó el sistema RTS *E.coli* 100 HY System, según las instrucciones del fabricante. Se suplementaron cien µl de mezcla con 40 unidades (1 µl) de Rnasin, 2 µM (2 µl) de oligonucleótido anti ssrA 5'-TTAAGCTGCTAAAGCGTAGTTTTTCGTCGTTTGCRACTA-3' (identificador de secuencia n°:85), 1 µl de solución stock de Inhibidor mini proteasa completo sin EDTA y 500 ng de molde de ADN para presentación en ribosomas en

20 µl de mezcla PWO-PCR. El molde de ADN para presentación en ribosomas se transcribió y tradujo en tubos de 1,5 ml a 30 °C durante 40 minutos con agitación a 550 rpm. Los complejos formados con ARNm, ribosoma y el polipéptido presentado se estabilizaron deteniendo la reacción de forma inmediata con 500 µl de tampón SB helado. La mezcla se centrifugó a 15.000 rpm a 2 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos de reacción de 1,5 ml helados. Se transfirieron doscientos cincuenta µl de mezcla a placas MT recubiertas de ligando (señal) y otros 250 µl en pocillos no recubiertos de ligando (fondo). La mezcla se incubó durante 1 hora a 4 °C y 300 rpm. Para eliminar la proteína de fondo y los complejos ternarios con una unión débil se lavaron los pocillos con tampón WB helado. Se eluyó el ARN de los complejos ternarios unidos con 100 µl de tampón EB helado durante 10 minutos a 4 °C y 750 rpm.

f) Preparación de perlas magnéticas recubiertas de Proteína G.

Las perlas magnéticas recubiertas de Proteína G se utilizaron para vaciar las mezclas de traducción para presentación en ribosomas de derivados proteicos que reconocieran de forma no específica los elementos de unión a IgG1-FC. Se equilibraron 100 µl de suspensión de perlas magnéticas con tampón de parada SB lavando las perlas cinco veces con 500 µl de tampón SB. Se incubaron las perlas durante 1 hora a 4 °C en 500 µl de tampón SB con 50 µg de proteína IgG1-FC. Las perlas se lavaron tres veces con tampón SB y se almacenaron en hielo en cien µl de tampón SB. Previamente a su utilización, las perlas se separaron magnéticamente y se almacenaron en hielo. Se añadió a las perlas mezcla de traducción para presentación en ribosomas detenida. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 4 °C a 750 rpm. Previamente a su utilización, las perlas se separaron magnéticamente de la mezcla.

g) Purificación del ARNm y eliminación del ADN remanente

Se purificó el ARN mensajero utilizando el kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Se eliminó el molde de ADN remanente en el eluato con un protocolo modificado del kit Ambion DNA-free (Ambion Inc, EE.UU.). Se suplementaron cincuenta µl de eluato con 5,7 µl de tampón de ADNasa I y 1,3 µl solución de ADNasa I. Tras incubar la mezcla a 37 °C durante 30 minutos se añadieron 6,5 µl de reactivo de inactivación de la ADNasa I. Esta mezcla pastosa se incubó en ensayo de digestión durante 3 minutos a temperatura ambiente seguida de 1 minuto de centrifugación a 11.000g. El sobrenadante se utilizó en la transcripción inversa.

h) Transcripción inversa y amplificación del ADNc.

Para la transcripción inversa se utilizó el kit *C. therm.* RT Polymerase Kit (Roche Applied Sciences Mannheim, Alemania). Se unieron veinte µl de: 4 µl tampón RT 5x, 1 µl de solución de DTT (ditiotretitol), 1,6 µl de dNTPs, 1 µl de solución de DMSO, 0,1 µM (1 µl) de RT 5'-CAGAGCCTGCACCAGCTCCAGAGCCAGC-3' (identificador de secuencia nº:86), 40 unidades (1 µl) de Rnasin, 1,5 µl de polimerasa ARN de *C. therm.*, 9 µl de eluato conteniendo ARNm. La transcripción se llevó a cabo durante 35 minutos a 70 °C. Se realizó una amplificación adicional del ADN en 100 µl de PWO-PCR con 10 µl de tampón PWO-PCR 10x, con MgSO₄, dNTPs 200 µM, 12 µl de mezcla de transcripción, 2,5 unidades de ADN polimerasa PWO y los cebadores RT 5'-CAGAGCCTGCACCAGCTCCAGAGCCAGC-3' (identificador de secuencia nº:86) y F1 5'-GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG-3' (identificador de secuencia nº:87) ambos a una concentración de 1 µM. El perfil de PCR fue TIM: 1 minuto a 94 °C, TM: 20 segundos a 94°C, TA: 30 segundos a 60°C; TE: 60 segundos a 72 °C, 20 ciclos, TFE: 5 minutos a 72°C. Se realizó una re-amplificación mediante PWO-PCR estándar. Se transfirieron dos µl de mezcla de PCR a una segunda PWO-PCR. Siempre que fue posible, se utilizaron cebadores puente específicos de gen. Los perfiles de PCR fueron acordes a los parámetros físicos de los moldes de genes y los oligonucleótidos cebadores. Se realizaron 25 ciclos de PCR. Las secuencias de los genes se alargaron con superposiciones de ADN para que se hibridaran con los módulos de ADN T7Pg10epsilon y el separador de presentación en ribosomas en una OEL-PCR adicional. Los moldes de ADN de presentación en ribosomas se reutilizaron a continuación en ciclos adicionales de presentación en ribosomas.

i) Subclonado de los genes tras la presentación en ribosomas

Los productos de PCR se subclonaron en sistemas vector mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Los miembros de la biblioteca PEX2 se subclonaron a través de los sitios NdeI/EcoRI dentro del vector pUC18 utilizando los cebadores NdeIPEX2for (identificador de secuencia nº:83) y EcoRI-PEX2rev (identificador de secuencia nº:84)

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Estructura tipo hemopexina tal como un andamiaje polipéptico
 <130> 22953

10 <150> EP 05000013.2
 <151> 2005-01-03
 <160> 88

15 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 195
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de consenso

25 <400> 1
 Pro Glu Ile Cys Lys Gln Asp Ile Val Phe Asp Gly Ile Ala Gln Ile
 1 5 10 15
 Arg Gly Glu Ile Phe Phe Phe Lys Asp Arg Phe Ile Trp Arg Thr Val
 20 25 30
 Thr Pro Arg Asp Lys Pro Met Gly Pro Leu Leu Val Ala Thr Phe Trp
 35 40 45
 Pro Glu Leu Pro Glu Lys Ile Asp Ala Val Tyr Glu Ala Pro Gln Glu
 50 55 60
 Glu Lys Ala Val Phe Phe Ala Gly Asn Glu Tyr Trp Ile Tyr Ser Ala
 65 70 75 80
 Ser Thr Leu Glu Arg Gly Tyr Pro Lys Pro Leu Thr Ser Leu Gly Leu
 85 90 95
 Pro Pro Asp Val Gln Arg Val Asp Ala Ala Phe Asn Trp Ser Lys Asn
 100 105 110
 Lys Lys Thr Tyr Ile Phe Ala Gly Asp Lys Phe Trp Arg Tyr Asn Glu
 115 120 125
 Val Lys Lys Lys Met Asp Pro Gly Phe Pro Lys Leu Ile Ala Asp Ala

ES 2 376 586 T3

130

135

140

Trp Asn Ala Ile Pro Asp Asn Leu Asp Ala Val Val Asp Leu Gln Gly
145 150 155 160

Gly Gly His Ser Tyr Phe Phe Lys Gly Ala Tyr Tyr Leu Lys Leu Glu
165 170 175

Asn Gln Ser Leu Lys Ser Val Lys Phe Gly Ser Ile Lys Ser Asp Trp
180 185 190

Leu Gly Cys
195

<210> 2
<211> 195
<212> PRT
<213> Gallus gallus
<400> 2

5

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

Arg Gly Glu Ile Phe Phe Phe Lys Asp Arg Phe Met Trp Arg Thr Val
20 25 30

Asn Pro Arg Gly Lys Pro Thr Gly Pro Leu Leu Val Ala Thr Phe Trp
35 40 45

Pro Asp Leu Pro Glu Lys Ile Asp Ala Val Tyr Glu Ser Pro Gln Asp
50 55 60

Glu Lys Ala Val Phe Phe Ala Gly Asn Glu Tyr Trp Val Tyr Thr Ala
65 70 75 80

Ser Asn Leu Asp Arg Gly Tyr Pro Lys Lys Leu Thr Ser Leu Gly Leu
85 90 95

Pro Pro Asp Val Gln Arg Ile Asp Ala Ala Phe Asn Trp Gly Arg Asn
100 105 110

Lys Lys Thr Tyr Ile Phe Ser Gly Asp Arg Tyr Trp Lys Tyr Asn Glu
115 120 125

ES 2 376 586 T3

Glu Lys Lys Lys Met Glu Leu Ala Thr Pro Lys Phe Ile Ala Asp Ser
 130 135 140 .

Trp Asn Gly Val Pro Asp Asn Leu Asp Ala Val Leu Gly Leu Thr Asp
 145 150 155 160

Ser Gly Tyr Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Tyr Tyr Leu Gln Met Glu
 165 170 175

Asp Lys Ser Leu Lys Ile Val Lys Ile Gly Lys Ile Ser Ser Asp Trp
 180 185 190

Leu Gly Cys
 195

<210> 3
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 3

Met Ala Ala Arg Glu Glu Ser Thr Gln Ser Ala Asn Arg Val Leu Arg
 1 5 10 15

Ile Ser Gln Leu Asp Ala Leu Glu Leu Asn Lys Ala Leu Glu Gln Leu
 20 25 30

Val Trp Ser Gln Phe Thr Gln Cys Phe His Gly Phe Lys Pro Gly Leu
 35 40 45

Leu Ala Arg Phe Glu Pro Glu Val Lys Ala Phe Leu Trp Leu Phe Leu
 50 55 60

Trp Arg Phe Thr Ile Tyr Ser Lys Asn Ala Thr Val Gly Gln Ser Val
 65 70 75 80

Leu Asn Ile Gln His Lys Asn Asp Ser Ser Pro Asn Pro Val Tyr Gln
 85 90 95

Pro Pro Ser Lys Asn Gln Lys Leu Leu Tyr Ala Val Cys Thr Ile Gly
 100 105 110

Gly Arg Trp Leu Glu Glu Arg Cys Tyr Asp Leu Phe Arg Asn Arg His
 115 120 125

10

ES 2 376 586 T3

Leu Ala Ser Phe Gly Lys Ala Lys Gln Cys Met Asn Phe Val Val Gly
 130 135 140

Leu Leu Lys Leu Gly Glu Leu Met Asn Phe Leu Ile Phe Leu Gln Lys
 145 150 155 160

Gly Lys Phe Ala Thr Leu Thr Glu Arg Leu Leu Gly Ile His Ser Val
 165 170 175

Phe Cys Lys Pro Gln Asn Met Arg Glu Val Gly Phe Glu Tyr Met Asn
 180 185 190

Arg Glu Leu Leu Trp His Gly Phe Ala Glu Phe Leu Ile Phe Leu Leu
 195 200 205

Pro Leu Ile Asn Ile Gln Lys Leu Lys Ala Lys Leu Ser Ser Trp Cys
 210 215 220

Thr Leu Cys Thr Gly Ala Ala Gly His Asp Ser Thr Leu Gly Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Lys Glu Cys Ala Leu Cys Gly Glu Trp Pro Thr Met Pro His Thr
 245 250 255

Ile Gly Cys Glu His Val Phe Cys Tyr Tyr Cys Val Lys Ser Ser Phe
 260 265 270

Leu Phe Asp Ile Tyr Phe Thr Cys Pro Lys Cys Gly Thr Glu Val His
 275 280 285

Ser Val Gln Pro Leu Lys Ala Gly Ile Gln Met Ser Glu Val Asn Ala
 290 295 300

Leu
 305

- <210> 4
- 5 <211> 305
- <212> PRT
- <213> Rattus norvegicus

<400> 4

ES 2 376 586 T3

Met Ala Ala Arg Glu Glu Ser Thr Gln Ser Ala Asn Arg Val Leu Arg
 1 5 10 15

Ile Ser Gln Leu Asp Ala Leu Glu Leu Asn Lys Ala Leu Glu Gln Leu
 20 25 30

Val Trp Ser Gln Phe Thr Gln Cys Phe His Gly Phe Lys Pro Gly Leu
 35 40 45

Leu Ala Arg Phe Glu Pro Glu Val Lys Ala Phe Leu Trp Leu Phe Leu
 50 55 60

Trp Arg Phe Thr Ile Tyr Ser Lys Asn Ala Thr Val Gly Gln Ser Val
 65 70 75 80

Leu Asn Ile Gln Tyr Lys Asn Asp Ser Ser Pro Asn Pro Val Tyr Gln
 85 90 95

Pro Pro Ser Lys Asn Gln Lys Leu Leu Tyr Ala Val Cys Thr Ile Gly
 100 105 110

Gly Arg Trp Leu Glu Glu Arg Cys Tyr Asp Leu Phe Arg Asn Arg His
 115 120 125

Leu Ala Ser Phe Gly Lys Ala Lys Gln Cys Met Asn Phe Val Val Gly
 130 135 140

Leu Leu Lys Leu Gly Glu Leu Met Asn Phe Leu Ile Phe Leu Gln Lys
 145 150 155 160

Gly Lys Phe Ala Thr Leu Thr Glu Arg Leu Leu Gly Ile His Ser Val
 165 170 175

Phe Cys Lys Pro Gln Ser Met Arg Glu Val Gly Phe Glu Tyr Met Asn
 180 185 190

Arg Glu Leu Leu Trp His Gly Phe Ala Glu Phe Leu Val Phe Leu Leu
 195 200 205

Pro Leu Ile Asn Ile Gln Lys Leu Lys Ala Lys Leu Ser Ser Trp Cys
 210 215 220

Ile Pro Leu Thr Ser Thr Ala Gly Ser Asp Ser Thr Leu Gly Ser Ser
 225 230 235 240

ES 2 376 586 T3

Gly Lys Glu Cys Ala Leu Cys Gly Glu Trp Pro Thr Met Pro His Thr
 245 250 255

Ile Gly Cys Glu His Val Phe Cys Tyr Tyr Cys Val Lys Ser Ser Phe
 260 265 270

Leu Phe Asp Met Tyr Phe Thr Cys Pro Lys Cys Gly Thr Glu Val His
 275 280 285

Ser Val Gln Pro Leu Lys Ser Gly Ile Glu Met Ser Glu Val Asn Ala
 290 295 300

Leu
 305

<210> 5
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5

<400> 5

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

Arg Gly Glu Ile Phe Phe Phe Lys Asp Arg Phe Ile Trp Arg Thr Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Asp Lys Pro Met Gly Pro Leu Leu Val Ala Thr Phe Trp
 35 40 45

Pro Glu Leu Pro Glu Lys Ile Asp Ala Val Tyr Glu Ala Pro Gln Glu
 50 55 60

Glu Lys Ala Val Phe Phe Ala Gly Asn Glu Tyr Trp Val Tyr Ser Ala
 65 70 75 80

Ser Thr Leu Glu Arg Gly Tyr Pro Lys Pro Leu Thr Ser Leu Gly Leu
 85 90 95

Pro Pro Asp Val Gln Arg Val Asp Ala Ala Phe Asn Trp Ser Lys Asn
 100 105 110

Lys Lys Thr Tyr Ile Phe Ala Gly Asp Lys Phe Trp Arg Tyr Asn Glu

10

ES 2 376 586 T3

115

120

125

Val Lys Lys Lys Met Asp Pro Gly Phe Pro Arg Leu Ile Ala Asp Ala
 130 135 140

Trp Asn Ala Ile Pro Asp His Leu Asp Ala Val Val Asp Leu Gln Gly
 145 150 155 160

Ser Gly His Ser Tyr Phe Phe Lys Gly Thr Tyr Tyr Leu Lys Leu Glu
 165 170 175

Asn Gln Ser Leu Lys Ser Val Lys Val Gly Ser Ile Lys Thr Asp Trp
 180 185 190

Leu Gly Cys
 195

<210> 6
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

5

<400> 6

Pro Glu Val Cys Asp Ser Lys Leu Thr Phe Asp Ala Ile Thr Thr Ile
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Val Met Phe Phe Lys Asp Arg Phe Tyr Met Arg Thr Asn
 20 25 30

Pro Leu Tyr Pro Glu Val Glu Leu Asn Phe Ile Ser Val Phe Trp Pro
 35 40 45

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

Glu Val Arg Phe Phe Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Ala Val Lys Gly Gln
 65 70 75 80

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

Pro Arg Thr Val Lys Ser Ile Asp Ala Ala Val Ser Glu Glu Asp Thr
 100 105 110

10

ES 2 376 586 T3

Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Val Ala Asn Lys Cys Trp Arg Tyr Asp Glu
 115 120 125

Tyr Lys Gln Ser Met Asp Ala Gly Tyr Pro Lys Met Ile Ala Glu Asp
 130 135 140

Phe Pro Gly Ile Gly Asn Lys Val Asp Ala Val Phe Gln Lys Gly Gly
 145 150 155 160

Phe Phe Tyr Phe Phe His Gly Arg Arg Gln Tyr Lys Phe Asp Pro Gln
 165 170 175

Thr Lys Arg Ile Leu Thr Leu Leu Lys Ala Asn Ser Trp Phe Asn Cys
 180 185 190

Arg Lys Asn
 195

<210> 7
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Equus caballus

5

<400> 7

Pro Glu Val Cys Asp Ser Lys Leu Thr Phe Asp Ala Ile Thr Thr Ile
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Val Met Phe Phe Lys Asp Arg Phe Tyr Met Arg Ile Asn
 20 25 30

Pro Tyr Tyr Pro Glu Ala Glu Leu Asn Phe Ile Ser Ile Phe Trp Pro
 35 40 45

Gln Leu Pro Asn Gly Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Val Ser His Arg Asp
 50 55 60

Glu Val Arg Phe Phe Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Ala Val Lys Gly Gln
 65 70 75 80

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

Pro Ser Thr Val Lys Asn Ile Asp Ala Ala Val Ser Glu Glu Asp Thr
 100 105 110

10

ES 2 376 586 T3

Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Val Ala Asp Lys Tyr Trp Arg Tyr Asp Glu
 115 120 125

Tyr Lys Arg Ser Met Asp Ala Gly Tyr Pro Lys Met Ile Ala Asp Asp
 130 135 140

Phe Pro Gly Ile Gly Asp Lys Val Asp Ala Val Phe Gln Lys Asp Gly
 145 150 155 160

Phe Phe Tyr Phe Phe His Gly Thr Arg Gln Tyr Lys Phe Asp Pro Lys
 165 170 175

Thr Lys Arg Ile Leu Thr Leu Gln Lys Ala Asn Ser Trp Phe Asn Cys
 180 185 190

Arg Lys Asn
 195

5 <210> 8
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 8

Pro Lys Ala Cys Asp Ser Lys Leu Thr Phe Asp Ala Ile Thr Thr Ile
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Val Met Phe Phe Lys Asp Arg Phe Tyr Met Arg Thr Asn
 20 25 30

Pro Phe Tyr Pro Glu Val Glu Leu Asn Phe Ile Ser Val Phe Trp Pro
 35 40 45

Gln Leu Pro Asn Gly Leu Glu Ala Ala Tyr Glu Phe Ala Asp Arg Asp
 50 55 60

Glu Val Arg Phe Phe Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Ala Val Gln Gly Gln
 65 70 75 80

Asn Val Leu His Gly Tyr Pro Lys Asp Ile Tyr Ser Ser Phe Gly Phe
 85 90 95

Pro Arg Thr Val Lys His Ile Asp Ala Ala Leu Ser Glu Glu Asn Thr
 100 105 110

ES 2 376 586 T3

Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Val Ala Asn Lys Tyr Trp Arg Tyr Asp Glu
 115 120 125

Tyr Lys Arg Ser Met Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Met Ile Ala His Asp
 130 135 140

Phe Pro Gly Ile Gly His Lys Val Asp Ala Val Phe Met Lys Asp Gly
 145 150 155 160

Phe Phe Tyr Phe Phe His Gly Thr Arg Gln Tyr Lys Phe Asp Pro Lys
 165 170 175

Thr Lys Arg Ile Leu Thr Leu Gln Lys Ala Asn Ser Trp Phe Asn Cys
 180 185 190

Arg Lys Asn
 195

<210> 9
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 9

Pro Gln Val Cys Asp Ser Lys Leu Thr Phe Asp Ala Ile Thr Thr Leu
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Leu Met Phe Phe Lys Asp Arg Phe Tyr Met Arg Thr Asn
 20 25 30

Ser Phe Tyr Pro Glu Val Glu Leu Asn Phe Ile Ser Val Phe Trp Pro
 35 40 45

Gln Val Pro Asn Gly Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ile Ala Asp Arg Asp
 50 55 60

Glu Val Arg Phe Phe Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Ala Val Arg Gly Gln
 65 70 75 80

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

Pro Ser Thr Val Lys Asn Ile Asp Ala Ala Val Phe Glu Glu Asp Thr

ES 2 376 586 T3

100 105 110

Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Val Ala His Glu Cys Trp Arg Tyr Asp Glu
 115 120 125

Tyr Lys Gln Ser Met Asp Thr Gly Tyr Pro Lys Met Ile Ala Glu Glu
 130 135 140

Phe Pro Gly Ile Gly Asn Lys Val Asp Ala Val Phe Gln Lys Asp Gly
 145 150 155 160

Phe Leu Tyr Phe Phe His Gly Thr Arg Gln Tyr Gln Phe Asp Phe Lys
 165 170 175

Thr Lys Arg Ile Leu Thr Leu Gln Lys Ala Asn Ser Trp Phe Asn Cys
 180 185 190

Arg Lys Asn
 195

<210> 10
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

5
 10

Pro Glu Ile Cys Lys Gln Asp Ile Val Phe Asp Gly Ile Ala Gln Ile
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Ile Phe Phe Phe Lys Asp Arg Phe Ile Trp Arg Thr Val
 20 25 30

Thr Pro Arg Asp Lys Pro Met Gly Pro Leu Leu Val Ala Thr Phe Trp
 35 40 45

Pro Glu Leu Pro Glu Lys Ile Asp Ala Val Tyr Glu Ala Pro Gln Glu
 50 55 60

Glu Lys Ala Val Phe Phe Ala Gly Asn Glu Tyr Trp Ile Tyr Ser Ala
 65 70 75 80

Ser Thr Leu Glu Arg Gly Tyr Pro Lys Pro Leu Thr Ser Leu Gly Leu
 85 90 95

ES 2 376 586 T3

Pro Pro Asp Val Gln Arg Val Asp Ala Ala Phe Asn Trp Ser Lys Asn
 100 105 110

Lys Lys Thr Tyr Ile Phe Ala Gly Asp Lys Phe Trp Arg Tyr Asn Glu
 115 120 125

Val Lys Lys Lys Met Asp Pro Gly Phe Pro Lys Leu Ile Ala Asp Ala
 130 135 140

Trp Asn Ala Ile Pro Asp Asn Leu Asp Ala Val Val Asp Leu Gln Gly
 145 150 155 160

Gly Gly His Ser Tyr Phe Phe Lys Gly Ala Tyr Tyr Leu Lys Leu Glu
 165 170 175

Asn Gln Ser Leu Lys Ser Val Lys Phe Gly Ser Ile Lys Ser Asp Trp
 180 185 190

Leu Gly Cys
 195

<210> 11
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 11

Pro Ala Asn Cys Asp Pro Ala Leu Ser Phe Asp Ala Val Ser Thr Leu
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Ile Leu Ile Phe Lys Asp Arg His Phe Trp Arg Lys Ser
 20 25 30

Leu Arg Lys Leu Glu Pro Glu Leu His Leu Ile Ser Ser Phe Trp Pro
 35 40 45

Ser Leu Pro Ser Gly Val Asp Ala Ala Tyr Glu Val Thr Ser Lys Asp
 50 55 60

Leu Val Phe Ile Phe Lys Gly Asn Gln Phe Trp Ala Ile Arg Gly Asn
 65 70 75 80

Glu Val Arg Ala Gly Tyr Pro Arg Gly Ile His Thr Leu Gly Phe Pro
 85 90 95

10

ES 2 376 586 T3

Pro Thr Val Arg Lys Ile Asp Ala Ala Ile Ser Asp Lys Glu Lys Asn
 100 105 110

Lys Thr Tyr Phe Phe Val Glu Asp Lys Tyr Trp Arg Phe Asp Glu Lys
 115 120 125

Arg Asn Ser Met Glu Pro Gly Phe Pro Lys Gln Ile Ala Glu Asp Phe
 130 135 140

Pro Gly Ile Asp Ser Lys Ile Asp Ala Val Phe Glu Glu Phe Gly Phe
 145 150 155 160

Phe Tyr Phe Phe Thr Gly Ser Ser Gln Leu Glu Phe Asp Pro Asn Ala
 165 170 175

Lys Lys Val Thr His Thr Leu Lys Ser Asn Ser Trp Leu Asn Cys
 180 185 190

<210> 12
 <211> 191
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12

Ser Pro Met Cys Ser Ser Thr Leu Phe Phe Asp Ala Val Ser Thr Leu
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Val Leu Phe Phe Lys Asp Arg His Phe Trp Arg Lys Ser
 20 25 30

Leu Arg Thr Pro Glu Pro Glu Phe Tyr Leu Ile Ser Ser Phe Trp Pro
 35 40 45

Ser Leu Pro Ser Asn Met Asp Ala Ala Tyr Glu Val Thr Asn Arg Asp
 50 55 60

Thr Val Phe Ile Phe Lys Gly Asn Gln Phe Trp Ala Ile Arg Gly His
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Gly Tyr Pro Lys Ser Ile His Thr Leu Gly Leu Pro
 85 90 95

Ala Thr Val Lys Lys Ile Asp Ala Ala Ile Ser Asn Lys Glu Lys Arg
 100 105 110

10

ES 2 376 586 T3

Lys Thr Tyr Phe Phe Val Glu Asp Lys Tyr Trp Arg Phe Asp Glu Lys
 115 120 125

Lys Gln Ser Met Glu Pro Gly Phe Pro Arg Lys Ile Ala Glu Asp Phe
 130 135 140

Pro Gly Val Asp Ser Arg Val Asp Ala Val Phe Glu Ala Phe Gly Phe
 145 150 155 160

Leu Tyr Phe Phe Ser Gly Ser Ser Gln Leu Glu Phe Asp Pro Asn Ala
 165 170 175

Lys Lys Val Thr His Ile Leu Lys Ser Asn Ser Trp Phe Asn Cys
 180 185 190

<210> 13

<211> 191

5 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 13

Pro Val Met Cys Asp Pro Asp Leu Ser Phe Asp Ala Ile Ser Thr Leu
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Ile Leu Phe Phe Lys Asp Arg Tyr Phe Trp Arg Lys Ser
 20 25 30

Leu Arg Ile Leu Glu Pro Glu Phe His Leu Ile Ser Ser Phe Trp Pro
 35 40 45

Ser Leu Pro Ser Ala Val Asp Ala Ala Tyr Glu Val Ile Ser Arg Asp
 50 55 60

Thr Val Phe Ile Phe Lys Gly Thr Gln Phe Trp Ala Ile Arg Gly Asn
 65 70 75 80

Glu Val Gln Ala Gly Tyr Pro Arg Ser Ile His Thr Leu Gly Phe Pro
 85 90 95

Ser Thr Ile Arg Lys Ile Asp Ala Ala Ile Ser Asp Lys Glu Arg Lys
 100 105 110

10 Lys Thr Tyr Phe Phe Val Glu Asp Lys Tyr Trp Arg Phe Asp Glu Lys

ES 2 376 586 T3

115

120

125

Arg Gln Ser Leu Glu Pro Gly Phe Pro Arg His Ile Ala Glu Asp Phe
 130 135 140

Pro Gly Ile Asn Pro Lys Ile Asp Ala Val Phe Glu Ala Phe Gly Phe
 145 150 155 160

Phe Tyr Phe Phe Ser Gly Ser Ser Gln Ser Glu Phe Asp Pro Asn Ala
 165 170 175

Lys Lys Val Thr His Val Leu Lys Ser Asn Ser Trp Phe Gln Cys
 180 185 190

<210> 14

<211> 191

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 14

Leu Pro Met Cys Ser Ser Ala Leu Ser Phe Asp Ala Val Ser Thr Leu
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Val Leu Phe Phe Lys Asp Arg His Phe Trp Arg Lys Ser
 20 25 30

Leu Arg Thr Pro Glu Pro Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Ser Phe Trp Pro
 35 40 45

Ser Leu Pro Ser Asn Met Asp Ala Ala Tyr Glu Val Thr Asn Arg Asp
 50 55 60

Thr Val Phe Ile Leu Lys Gly Asn Gln Ile Trp Ala Ile Arg Gly His
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Gly Tyr Pro Lys Ser Ile His Thr Leu Gly Leu Pro
 85 90 95

Glu Thr Val Gln Lys Ile Asp Ala Ala Ile Ser Leu Lys Asp Gln Lys
 100 105 110

Lys Thr Tyr Phe Phe Val Glu Asp Lys Phe Trp Arg Phe Asp Glu Lys
 115 120 125

10

ES 2 376 586 T3

Lys Gln Ser Met Asp Pro Glu Phe Pro Arg Lys Ile Ala Glu Asn Phe
 130 135 140

Pro Gly Ile Gly Thr Lys Val Asp Ala Val Phe Glu Ala Phe Gly Phe
 145 150 155 160

Leu Tyr Phe Phe Ser Gly Ser Ser Gln Leu Glu Phe Asp Pro Asn Ala
 165 170 175

Gly Lys Val Thr His Ile Leu Lys Ser Asn Ser Trp Phe Asn Cys
 180 185 190

<210> 15
 <211> 192
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Pro Lys Pro Cys Asp Pro Ser Leu Thr Phe Asp Ala Ile Thr Thr Leu
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Ile Leu Phe Phe Lys Asp Arg Tyr Phe Trp Arg Arg His
 20 25 30

Pro Gln Leu Gln Arg Val Glu Met Asn Phe Ile Ser Leu Phe Trp Pro
 35 40 45

Ser Leu Pro Thr Gly Ile Gln Ala Ala Tyr Glu Asp Phe Asp Arg Asp
 50 55 60

Leu Ile Phe Leu Phe Lys Gly Asn Gln Tyr Trp Ala Leu Ser Gly Tyr
 65 70 75 80

Asp Ile Leu Gln Gly Tyr Pro Lys Asp Ile Ser Asn Tyr Gly Phe Pro
 85 90 95

Ser Ser Val Gln Ala Ile Asp Ala Ala Val Phe Tyr Arg Ser Lys Thr
 100 105 110

Tyr Phe Phe Val Asn Asp Gln Phe Trp Arg Tyr Asp Asn Gln Arg Gln
 115 120 125

Phe Met Glu Pro Gly Tyr Pro Lys Ser Ile Ser Gly Ala Phe Pro Gly
 130 135 140

10

ES 2 376 586 T3

Ile Glu Ser Lys Val Asp Ala Val Phe Gln Gln Glu His Phe Phe His
145 150 155 160

Val Phe Ser Gly Pro Arg Tyr Tyr Ala Phe Asp Leu Ile Ala Gln Arg
165 170 175

Val Thr Arg Val Ala Arg Gly Asn Lys Trp Leu Asn Cys Arg Tyr Gly
180 185 190

<210> 16

<211> 190

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Pro Lys Ala Cys Asp Pro His Leu Arg Phe Asp Ala Thr Thr Thr Leu
1 5 10 15

Arg Gly Glu Ile Tyr Phe Phe Lys Glu Lys Tyr Phe Trp Arg Arg His
20 25 30

Pro Gln Leu Arg Thr Val Asp Leu Asn Phe Ile Ser Leu Phe Trp Pro
35 40 45

Gly Leu Pro Asn Gly Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Asp Phe Asp Arg Asp
50 55 60

Leu Val Phe Leu Phe Lys Gly Arg Gln Tyr Trp Ala Leu Ser Gly Tyr
65 70 75 80

Asp Leu Gln Gln Gly Tyr Pro Arg Asp Ile Ser Asn Tyr Gly Phe Pro
85 90 95

Arg Ser Val Gln Ala Ile Asp Ala Ala Val Ser Tyr Asn Gly Lys Thr
100 105 110

Tyr Phe Phe Ile Asn Asn Gln Cys Trp Arg Tyr Asp Asn Glu Arg Arg
115 120 125

Ser Met Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Ser Ile Pro Ser Met Phe Pro Gly
130 135 140

Val Asn Cys Arg Val Asp Ala Val Phe Leu Gln Asp Ser Phe Phe Leu
145 150 155 160

10

ES 2 376 586 T3

Phe Phe Ser Gly Pro Gln Tyr Phe Ala Phe Asn Phe Val Ser His Arg
 165 170 175

Val Thr Arg Val Ala Arg Ser Asn Leu Trp Leu Asn Cys Ser
 180 185 190

<210> 17
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 17

Pro Thr Ala Cys Asp Pro His Leu Arg Phe Asp Ala Ala Thr Thr Leu
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Ile Tyr Phe Phe Lys Asp Lys Tyr Phe Trp Arg Arg His
 20 25 30

Pro Gln Leu Arg Thr Val Asp Leu Asn Phe Ile Ser Leu Phe Trp Pro
 35 40 45

Phe Leu Pro Asn Gly Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Asp Phe Asp Arg Asp
 50 55 60

Leu Val Phe Leu Phe Lys Gly Arg Gln Tyr Trp Ala Leu Ser Ala Tyr
 65 70 75 80

Asp Leu Gln Gln Gly Tyr Pro Arg Asp Ile Ser Asn Tyr Gly Phe Pro
 85 90 95

Arg Ser Val Gln Ala Ile Asp Ala Ala Val Ser Tyr Asn Gly Lys Thr
 100 105 110

Tyr Phe Phe Val Asn Asn Gln Cys Trp Arg Tyr Asp Asn Gln Arg Arg
 115 120 125

Ser Met Asp Pro Gly Tyr Pro Thr Ser Ile Ala Ser Val Phe Pro Gly
 130 135 140

Ile Asn Cys Arg Ile Asp Ala Val Phe Gln Gln Asp Ser Phe Phe Leu
 145 150 155 160

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

ES 2 376 586 T3

165

170

175

Val Thr Arg Val Ala Arg Ser Asn Leu Trp Leu Asn Cys Pro
 180 185 190

<210> 18
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

5

<400> 18

Glu Asp Val Cys Asn Val Asp Ile Phe Asp Ala Ile Ala Glu Ile Arg
 1 5 10 15

Asn Arg Leu His Phe Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Trp Arg Leu Ser Glu
 20 25 30

Gly Gly Gly Arg Arg Val Gln Gly Pro Phe Leu Val Lys Ser Lys Trp
 35 40 45

Pro Ala Leu Pro Arg Lys Leu Asp Ser Ala Phe Glu Asp Pro Leu Thr
 50 55 60

Lys Lys Ile Phe Phe Phe Ser Gly Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly
 65 70 75 80

Ala Ser Leu Leu Gly Pro Arg Arg Leu Asp Lys Leu Gly Leu Gly Pro
 85 90 95

Glu Val Ala Gln Val Thr Gly Ala Leu Pro Arg Pro Glu Gly Lys Val
 100 105 110

Leu Leu Phe Ser Gly Gln Ser Phe Trp Arg Phe Asp Val Lys Thr Gln
 115 120 125

Lys Val Asp Pro Gln Ser Val Thr Pro Val Asp Gln Met Phe Pro Gly
 130 135 140

Val Pro Ile Ser Thr His Asp Ile Phe Gln Tyr Gln Glu Lys Ala Tyr
 145 150 155 160

Phe Cys Gln Asp His Phe Tyr Trp Arg Val Ser Ser Gln Asn Glu Val
 165 170 175

10

ES 2 376 586 T3

Asn Gln Val Asp Tyr Val Gly Tyr Val Thr Phe Asp Leu Leu Lys Cys
 180 185 190

Pro Glu Asp
 195

<210> 19
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris

5

<400> 19

Glu Asp Ile Cys Lys Val Asn Ile Phe Asp Ala Ile Ala Glu Ile Arg
 1 5 10 15

Asn Tyr Leu His Phe Phe Lys Glu Gly Lys Tyr Trp Arg Phe Ser Lys
 20 25 30

Gly Lys Gly Arg Arg Val Gln Gly Pro Phe Leu Ser Pro Ser Thr Trp
 35 40 45

Pro Ala Leu Pro Arg Lys Leu Asp Ser Ala Phe Glu Asp Gly Leu Thr
 50 55 60

Lys Lys Thr Phe Phe Phe Ser Gly Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly
 65 70 75 80

Thr Ser Val Val Gly Pro Arg Arg Leu Asp Lys Leu Gly Leu Gly Pro
 85 90 95

Glu Val Thr Gln Val Thr Gly Ala Leu Pro Gln Gly Gly Gly Lys Val
 100 105 110

Leu Leu Phe Ser Arg Gln Arg Phe Trp Ser Phe Asp Val Lys Thr Gln
 115 120 125

Thr Val Asp Pro Arg Ser Ala Gly Ser Val Glu Gln Met Tyr Pro Gly
 130 135 140

Val Pro Leu Asn Thr His Asp Ile Phe Gln Tyr Gln Glu Lys Ala Tyr
 145 150 155 160

Phe Cys Gln Asp Arg Phe Tyr Trp Arg Val Asn Ser Arg Asn Glu Val
 165 170 175

10

ES 2 376 586 T3

Asn Gln Val Asp Glu Val Gly Tyr Val Thr Phe Asp Ile Leu Gln Cys
 180 185 190

Pro Glu Asp
 195

<210> 20
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 20

Asp Asp Ala Cys Asn Val Asn Ile Phe Asp Ala Ile Ala Glu Ile Gly
 1 5 10 15

Asn Gln Leu Tyr Leu Phe Lys Asp Gly Lys Tyr Trp Arg Phe Ser Glu
 20 25 30

Gly Arg Gly Ser Arg Pro Gln Gly Pro Phe Leu Ile Ala Asp Lys Trp
 35 40 45

Pro Ala Leu Pro Arg Lys Leu Asp Ser Val Phe Glu Glu Pro Leu Ser
 50 55 60

Lys Lys Leu Phe Phe Phe Ser Gly Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly
 65 70 75 80

Ala Ser Val Leu Gly Pro Arg Arg Leu Asp Lys Leu Gly Leu Gly Ala
 85 90 95

Asp Val Ala Gln Val Thr Gly Ala Leu Arg Ser Gly Arg Gly Lys Met
 100 105 110

Leu Leu Phe Ser Gly Arg Arg Leu Trp Arg Phe Asp Val Lys Ala Gln
 115 120 125

Met Val Asp Pro Arg Ser Ala Ser Glu Val Asp Arg Met Phe Pro Gly
 130 135 140

Val Pro Leu Asp Thr His Asp Val Phe Gln Tyr Arg Glu Lys Ala Tyr
 145 150 155 160

Phe Cys Gln Asp Arg Phe Tyr Trp Arg Val Ser Ser Arg Ser Glu Leu

10

ES 2 376 586 T3

165

170

175

Asn Gln Val Asp Gln Val Gly Tyr Val Thr Tyr Asp Ile Leu Gln Cys
 180 185 190

Pro Glu Asp
 195

<210> 21
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 21

Asp Asn Pro Cys Asn Val Asp Val Phe Asp Ala Ile Ala Glu Ile Gln
 1 5 10 15

Gly Ala Leu His Phe Phe Lys Asp Gly Trp Tyr Trp Lys Phe Leu Asn
 20 25 30

His Arg Gly Ser Pro Leu Gln Gly Pro Phe Leu Thr Ala Arg Thr Trp
 35 40 45

Pro Ala Leu Pro Ala Thr Leu Asp Ser Ala Phe Glu Asp Pro Gln Thr
 50 55 60

Lys Arg Val Phe Phe Phe Ser Gly Arg Gln Met Trp Val Tyr Thr Gly
 65 70 75 80

Lys Thr Val Leu Gly Pro Arg Ser Leu Asp Lys Leu Gly Leu Gly Pro
 85 90 95

Glu Val Thr His Val Ser Gly Leu Leu Pro Arg Arg Pro Gly Lys Ala
 100 105 110

Leu Leu Phe Ser Lys Gly Arg Val Trp Arg Phe Asp Leu Lys Ser Gln
 115 120 125

Lys Val Asp Pro Gln Ser Val Ile Arg Val Asp Lys Glu Phe Ser Gly
 130 135 140

Val Pro Trp Asn Ser His Asp Ile Phe Gln Tyr Gln Asp Lys Ala Tyr
 145 150 155 160

10

ES 2 376 586 T3

Phe Cys His Gly Lys Phe Phe Trp Arg Val Ser Phe Gln Asn Glu Val
 165 170 175

Asn Lys Val Asp Pro Glu Val Asn Gln Val Asp Asp Val Gly Tyr Val
 180 185 190

Thr Tyr Asp Leu Leu Gln Cys Pro
 195 200

<210> 22
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 22

Pro Ala Lys Cys Asp Pro Ala Leu Ser Phe Asp Ala Ile Ser Thr Leu
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Tyr Leu Phe Phe Lys Asp Arg Tyr Phe Trp Arg Arg Ser
 20 25 30

His Trp Asn Pro Glu Pro Glu Phe His Leu Ile Ser Ala Phe Trp Pro
 35 40 45

Ser Leu Pro Ser Tyr Leu Asp Ala Ala Tyr Glu Val Asn Ser Arg Asp
 50 55 60

Thr Val Phe Ile Phe Lys Gly Asn Glu Phe Trp Ala Ile Arg Gly Asn
 65 70 75 80

Glu Val Gln Ala Gly Tyr Pro Arg Gly Ile His Thr Leu Gly Phe Pro
 85 90 95

Pro Thr Ile Arg Lys Ile Asp Ala Ala Val Ser Asp Lys Glu Lys Lys
 100 105 110

Lys Thr Tyr Phe Phe Ala Ala Asp Lys Tyr Trp Arg Phe Asp Glu Asn
 115 120 125

Ser Gln Ser Met Glu Gln Gly Phe Pro Arg Leu Ile Ala Asp Asp Phe
 130 135 140

Pro Gly Val Glu Pro Lys Val Asp Ala Val Leu Gln Ala Phe Gly Phe
 145 150 155 160

10

ES 2 376 586 T3

Phe Tyr Phe Phe Ser Gly Ser Ser Gln Phe Glu Phe Asp Pro Asn Ala
 165 170 175

Arg Met Val Thr His Ile Leu Lys Ser Asn Ser Trp Leu His Cys
 180 185 190

<210> 23
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 23

Pro Asp Lys Cys Asp Pro Ala Leu Ser Phe Asp Ser Val Ser Thr Leu
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Val Leu Phe Phe Lys Asp Arg Tyr Phe Trp Arg Arg Ser
 20 25 30

His Trp Asn Pro Glu Pro Glu Phe His Leu Ile Ser Ala Phe Trp Pro
 35 40 45

Thr Leu Pro Ser Asp Leu Asp Ala Ala Tyr Glu Ala His Asn Thr Asp
 50 55 60

Ser Val Leu Ile Phe Lys Gly Ser Gln Phe Trp Ala Val Arg Gly Asn
 65 70 75 80

Glu Val Gln Ala Gly Tyr Pro Lys Gly Ile His Thr Leu Gly Phe Pro
 85 90 95

Pro Thr Val Lys Lys Ile Asp Ala Ala Val Phe Glu Lys Glu Lys Lys
 100 105 110

Lys Thr Tyr Phe Phe Val Gly Asp Lys Tyr Trp Arg Phe Asp Glu Thr
 115 120 125

Arg His Val Met Asp Lys Gly Phe Pro Arg Gln Ile Thr Asp Asp Phe
 130 135 140

Pro Gly Ile Glu Pro Gln Val Asp Ala Val Leu His Glu Phe Gly Phe
 145 150 155 160

Phe Tyr Phe Phe Arg Gly Ser Ser Gln Phe Glu Phe Asp Pro Asn Ala
 165 170 175

10

ES 2 376 586 T3

Arg Thr Val Thr His Ile Leu Lys Ser Asn Ser Trp Leu Leu Cys
 180 185 190

5 <210> 24
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 24

Pro Asp Ala Cys Glu Ala Ser Phe Asp Ala Val Ser Thr Ile Arg Gly
 1 5 10 15

Glu Leu Phe Phe Phe Lys Ala Gly Phe Val Trp Arg Leu Arg Gly Gly
 20 25 30

Gln Leu Gln Pro Gly Tyr Pro Ala Leu Ala Ser Arg His Trp Gln Gly
 35 40 45

Leu Pro Ser Pro Val Asp Ala Ala Phe Glu Asp Ala Gln Gly His Ile
 50 55 60

Trp Phe Phe Gln Gly Ala Gln Tyr Trp Val Tyr Asp Gly Glu Lys Pro
 65 70 75 80

Val Leu Gly Pro Ala Pro Leu Thr Glu Leu Gly Leu Val Arg Phe Pro
 85 90 95

Val His Ala Ala Leu Val Trp Gly Pro Glu Lys Asn Lys Ile Tyr Phe
 100 105 110

Phe Arg Gly Arg Asp Tyr Trp Arg Phe His Pro Ser Thr Arg Arg Val
 115 120 125

Asp Ser Pro Val Pro Arg Arg Ala Thr Asp Trp Arg Gly Val Pro Ser
 130 135 140

Glu Ile Asp Ala Ala Phe Gln Asp Ala Asp Gly Tyr Ala Tyr Phe Leu
 145 150 155 160

Arg Gly Arg Leu Tyr Trp Lys Phe Asp Pro Val Lys Val Lys Ala Leu
 165 170 175

Glu Gly Phe Pro Arg Leu Val Gly Pro Asp Phe Phe Gly Cys Ala Glu

180

185

190

Pro Ala Asn Thr Phe Leu
195

5 <210> 25
<211> 198
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <400> 25

Pro Asp Val Cys Glu Thr Ser Phe Asp Ala Val Ser Thr Ile Arg Gly
1 5 10 15

Glu Leu Phe Phe Phe Lys Ala Gly Phe Val Trp Arg Leu Arg Ser Gly
20 25 30

Arg Leu Gln Pro Gly Tyr Pro Ala Leu Ala Ser Arg His Trp Gln Gly
35 40 45

Leu Pro Ser Pro Val Asp Ala Ala Phe Glu Asp Ala Gln Gly Gln Ile
50 55 60

Trp Phe Phe Gln Gly Ala Gln Tyr Trp Val Tyr Asp Gly Glu Lys Pro
65 70 75 80

Val Leu Gly Pro Ala Pro Leu Ser Lys Leu Gly Leu Gln Gly Ser Pro
85 90 95

Val His Ala Ala Leu Val Trp Gly Pro Glu Lys Asn Lys Ile Tyr Phe
100 105 110

Phe Arg Gly Gly Asp Tyr Trp Arg Phe His Pro Arg Thr Gln Arg Val
115 120 125

Asp Asn Pro Val Pro Arg Arg Ser Thr Asp Trp Arg Gly Val Pro Ser
130 135 140

Glu Ile Asp Ala Ala Phe Gln Asp Ala Glu Gly Tyr Ala Tyr Phe Leu
145 150 155 160

Arg Gly His Leu Tyr Trp Lys Phe Asp Pro Val Lys Val Lys Val Leu
165 170 175

ES 2 376 586 T3

Glu Gly Phe Pro Arg Pro Val Gly Pro Asp Phe Phe Asp Cys Ala Glu
 180 185 190

Pro Ala Asn Thr Phe Arg
 195

- <210> 26
- <211> 192
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 26

Pro Ala Leu Cys Asp Pro Asn Leu Ser Phe Asp Ala Val Thr Thr Val
 1 5 10 15

Gly Asn Lys Ile Phe Phe Phe Lys Asp Arg Phe Phe Trp Leu Lys Val
 20 25 30

Ser Glu Arg Pro Lys Thr Ser Val Asn Leu Ile Ser Ser Leu Trp Pro
 35 40 45

Thr Leu Pro Ser Gly Ile Glu Ala Ala Tyr Glu Ile Glu Ala Arg Asn
 50 55 60

Gln Val Phe Leu Phe Lys Asp Asp Lys Tyr Trp Leu Ile Ser Asn Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Glu Pro Asn Tyr Pro Lys Ser Ile His Ser Phe Gly Phe Pro
 85 90 95

Asn Phe Val Lys Lys Ile Asp Ala Ala Val Phe Asn Pro Arg Phe Tyr
 100 105 110

Arg Thr Tyr Phe Phe Val Asp Asn Gln Tyr Trp Arg Tyr Asp Glu Arg
 115 120 125

Arg Gln Met Met Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Leu Ile Thr Lys Asn Phe
 130 135 140

Gln Gly Ile Gly Pro Lys Ile Asp Ala Val Phe Tyr Ser Lys Asn Lys
 145 150 155 160

Tyr Tyr Tyr Phe Phe Gln Gly Ser Asn Gln Phe Glu Tyr Asp Phe Leu
 165 170 175

10

ES 2 376 586 T3

Leu Gln Arg Ile Thr Lys Thr Leu Lys Ser Asn Ser Trp Phe Gly Cys
 180 185 190

<210> 27
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 27

Ser Thr Phe Cys His Gln Ser Leu Ser Phe Asp Ala Val Thr Thr Val
 1 5 10 15

Gly Glu Lys Ile Leu Phe Phe Lys Asp Trp Phe Phe Trp Trp Lys Leu
 20 25 30

Pro Gly Ser Pro Ala Thr Asn Ile Thr Ser Ile Ser Ser Ile Trp Pro
 35 40 45

Ser Ile Pro Ser Ala Ile Gln Ala Ala Tyr Glu Ile Glu Ser Arg Asn
 50 55 60

Gln Leu Phe Leu Phe Lys Asp Glu Lys Tyr Trp Leu Ile Asn Asn Leu
 65 70 75 80

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

Ala Ser Val Lys Lys Val Asp Ala Ala Val Phe Asp Pro Leu Arg Gln
 100 105 110

Lys Val Tyr Phe Phe Val Asp Lys His Tyr Trp Arg Tyr Asp Val Arg
 115 120 125

Gln Glu Leu Met Asp Pro Ala Tyr Pro Lys Leu Ile Ser Thr His Phe
 130 135 140

Pro Gly Ile Lys Pro Lys Ile Asp Ala Val Leu Tyr Phe Lys Arg His
 145 150 155 160

Tyr Tyr Ile Phe Gln Gly Ala Tyr Gln Leu Glu Tyr Asp Pro Leu Phe
 165 170 175

10

Arg Arg Val Thr Lys Thr Leu Lys Ser Thr Ser Trp Phe Gly Cys
 180 185 190

ES 2 376 586 T3

<210> 28
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus

5

<400> 28

```

Pro Thr Ala Cys Asp His Asn Leu Lys Phe Asp Ala Val Thr Thr Val
1          5          10          15

Gly Asn Lys Ile Phe Phe Phe Lys Asp Ser Phe Phe Trp Trp Lys Ile
      20          25          30

Pro Lys Ser Ser Thr Thr Ser Val Arg Leu Ile Ser Ser Leu Trp Pro
      35          40          45

Thr Leu Pro Ser Gly Ile Glu Ala Ala Tyr Glu Ile Gly Asp Arg His
50          55          60

Gln Val Phe Leu Phe Lys Gly Asp Lys Phe Trp Leu Ile Ser His Leu
65          70          75          80

Arg Leu Gln Pro Asn Tyr Pro Lys Ser Ile His Ser Leu Gly Phe Pro
      85          90          95

Asp Phe Val Lys Lys Ile Asp Ala Ala Val Phe Asn Pro Ser Leu Arg
      100          105          110

Lys Thr Tyr Phe Phe Val Asp Asn Leu Tyr Trp Arg Tyr Asp Glu Arg
      115          120          125

Arg Glu Val Met Asp Ala Gly Tyr Pro Lys Leu Ile Thr Lys His Phe
130          135          140

Pro Gly Ile Gly Pro Lys Ile Asp Ala Val Phe Tyr Phe Gln Arg Tyr
145          150          155          160

Tyr Tyr Phe Phe Gln Gly Pro Asn Gln Leu Glu Tyr Asp Thr Phe Ser
      165          170          175

Ser Arg Val Thr Lys Lys Leu Lys Ser Asn Ser Trp Phe Asp Cys
      180          185          190
    
```

10 <210> 29
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

ES 2 376 586 T3

<400> 29

Ser Thr Val Cys His Gln Ser Leu Ser Phe Asp Ala Val Thr Thr Val
 1 5 10 15

Gly Asp Lys Ile Phe Phe Phe Lys Asp Trp Phe Phe Trp Trp Arg Leu
 20 25 30

Pro Gly Ser Pro Ala Thr Asn Ile Thr Ser Ile Ser Ser Met Trp Pro
 35 40 45

Thr Ile Pro Ser Gly Ile Gln Ala Ala Tyr Glu Ile Gly Gly Arg Asn
 50 55 60

Gln Leu Phe Leu Phe Lys Asp Glu Lys Tyr Trp Leu Ile Asn Asn Leu
 65 70 75 80

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

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

Lys Val Tyr Phe Phe Val Asp Lys Gln Tyr Trp Arg Tyr Asp Val Arg
 115 120 125

Gln Glu Leu Met Asp Ala Ala Tyr Pro Lys Leu Ile Ser Thr His Phe
 130 135 140

Pro Gly Ile Arg Pro Lys Ile Asp Ala Val Leu Tyr Phe Lys Arg His
 145 150 155 160

Tyr Tyr Ile Phe Gln Gly Ala Tyr Gln Leu Glu Tyr Asp Pro Leu Leu
 165 170 175

Asp Arg Val Thr Lys Thr Leu Ser Ser Thr Ser Trp Phe Gly Cys
 180 185 190

- 5 <210> 30
- <211> 191
- <212> PRT
- <213> Bos taurus

10 <400> 30

ES 2 376 586 T3

Pro Asp Lys Cys Asp Pro Ser Leu Ser Leu Asp Ala Ile Thr Ser Leu
1 5 10 15

Arg Gly Glu Thr Leu Ile Phe Lys Asp Arg Phe Phe Trp Arg Leu His
20 25 30

Pro Gln Gln Val Glu Ala Glu Leu Phe Leu Thr Lys Ser Phe Gly Pro
35 40 45

Glu Leu Pro Asn Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu His Pro Ser His Asp
50 55 60

Leu Ile Phe Ile Phe Arg Gly Arg Lys Phe Trp Ala Leu Ser Gly Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Leu Glu Asp Tyr Pro Lys Lys Ile Ser Glu Leu Gly Phe Pro
85 90 95

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

Lys Thr Leu Phe Phe Ser Glu Asn Gln Val Trp Ser Tyr Asp Asp Thr
115 120 125

Asn His Val Met Asp Lys Asp Tyr Pro Arg Leu Ile Glu Glu Val Phe
130 135 140

Pro Gly Ile Gly Asp Lys Val Asp Ala Val Tyr Gln Lys Asn Gly Tyr
145 150 155 160

Ile Tyr Phe Phe Asn Gly Pro Ile Gln Phe Glu Tyr Ser Ile Trp Ser
165 170 175

Asn Arg Ile Val Arg Val Met Thr Thr Asn Ser Leu Leu Trp Cys
180 185 190

<210> 31

<211> 191

5 <212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 31

ES 2 376 586 T3

Pro Asp Lys Cys Asp Pro Ser Leu Ser Leu Asp Ala Ile Thr Ser Leu
1 5 10 15

Arg Gly Glu Thr Met Val Phe Lys Asp Arg Phe Phe Trp Arg Leu His
20 25 30

Pro Gln Leu Val Asp Ala Glu Leu Phe Leu Thr Lys Ser Phe Trp Pro
35 40 45

Glu Leu Pro Asn Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu His Pro Ser Lys Asp
50 55 60

Leu Ile Phe Ile Phe Arg Gly Arg Lys Phe Trp Ala Leu Asn Gly Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Leu Glu Gly Tyr Pro Gln Lys Ile Ser Glu Leu Gly Phe Pro
85 90 95

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

Lys Thr Leu Phe Phe Ser Gly Asn Gln Val Trp Arg Tyr Asp Asp Thr
115 120 125

Asn Arg Met Met Asp Lys Asp Tyr Pro Arg Leu Ile Glu Glu Asp Phe
130 135 140

Pro Gly Ile Gly Asp Lys Val Asp Ala Val Tyr Glu Lys Asn Gly Tyr
145 150 155 160

Ile Tyr Phe Phe Asn Gly Pro Ile Gln Phe Glu Tyr Ser Ile Trp Ser
165 170 175

Asn Arg Ile Val Arg Val Met Pro Thr Asn Ser Leu Leu Trp Cys
180 185 190

<210> 32
<211> 191
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 32

ES 2 376 586 T3

Pro Asp Lys Cys Asp Pro Ser Leu Ser Leu Asp Ala Ile Thr Ser Leu
1 5 10 15

Arg Gly Glu Thr Met Ile Phe Lys Asp Arg Phe Phe Trp Arg Leu His
20 25 30

Pro Gln Gln Val Asp Ala Glu Leu Phe Leu Thr Lys Ser Phe Trp Pro
35 40 45

Glu Leu Pro Asn Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu His Pro Ser His Asp
50 55 60

Leu Ile Phe Ile Phe Arg Gly Arg Lys Phe Trp Ala Leu Asn Gly Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Leu Glu Gly Tyr Pro Lys Lys Ile Ser Glu Leu Gly Leu Pro
85 90 95

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

Lys Thr Leu Leu Phe Ser Gly Asn Gln Val Trp Arg Tyr Asp Asp Thr
115 120 125

Asn His Ile Met Asp Lys Asp Tyr Pro Arg Leu Ile Glu Glu Asp Phe
130 135 140

Pro Gly Ile Gly Asp Lys Val Asp Ala Val Tyr Glu Lys Asn Gly Tyr
145 150 155 160

Ile Tyr Phe Phe Asn Gly Pro Ile Gln Phe Glu Tyr Ser Ile Trp Ser
165 170 175

Asn Arg Ile Val Arg Val Met Pro Ala Asn Ser Ile Leu Trp Cys
180 185 190

<210> 33
<211> 191
5 <212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 33

Pro Asp Lys Cys Asp Pro Ser Leu Ser Leu Asp Ala Ile Thr Ser Leu
1 5 10 15

10

ES 2 376 586 T3

Arg Gly Glu Thr Met Ile Phe Lys Asp Arg Phe Phe Trp Arg Leu His
20 25 30

Pro Gln Gln Val Asp Ala Glu Leu Phe Leu Thr Lys Ser Phe Trp Pro
35 40 45

Glu Leu Pro Asn Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu His Pro Ala Arg Asp
50 55 60

Leu Ile Phe Ile Phe Arg Gly Lys Lys Phe Trp Ala Pro Asn Gly Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Leu Glu Gly Tyr Pro Gln Lys Leu Ser Glu Leu Gly Phe Pro
85 90 95

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

Lys Thr Leu Phe Phe Ser Gly Asn Gln Val Trp Ser Tyr Asp Asp Thr
115 120 125

Asn His Thr Met Asp Gln Asp Tyr Pro Arg Leu Ile Glu Glu Glu Phe
130 135 140

Pro Gly Ile Gly Gly Lys Val Asp Ala Val Tyr Glu Lys Asn Gly Tyr
145 150 155 160

Ile Tyr Phe Phe Asn Gly Pro Ile Gln Phe Glu Tyr Ser Ile Trp Ser
165 170 175

Lys Arg Ile Val Arg Val Met Pro Thr Asn Ser Leu Leu Trp Cys
180 185 190

<210> 34
<211> 196
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

10 Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Met Leu Arg Gly
1 5 10 15

ES 2 376 586 T3

Glu Met Phe Val Phe Lys Lys Arg Trp Phe Trp Arg Val Arg Asn Asn
 20 25 30

Gln Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Pro Ile Gly Gln Phe Trp Arg Gly
 35 40 45

Leu Pro Ala Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Glu Arg Lys Asp Gly Lys Phe
 .50 55 60

Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys His Trp Val Phe Asp Glu Ala Ser Leu
 65 70 75 80

Glu Pro Gly Tyr Pro Lys His Ile Lys Glu Leu Gly Arg Gly Leu Pro
 85 90 95

Thr Asp Lys Ile Asp Ala Ala Leu Phe Trp Met Pro Asn Gly Lys Thr
 100 105 110

Tyr Phe Phe Arg Gly Asn Lys Tyr Tyr Arg Phe Asn Glu Glu Leu Arg
 115 120 125

Ala Val Asp Ser Glu Tyr Pro Lys Asn Ile Lys Val Trp Glu Gly Ile
 130 135 140

Pro Glu Ser Pro Arg Gly Ser Phe Met Gly Ser Asp Glu Val Phe Thr
 145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Lys Phe Asn Asn Gln Lys Leu
 165 170 175

Lys Val Glu Pro Gly Tyr Pro Lys Ser Ala Leu Arg Asp Trp Met Gly
 180 185 190

Cys Pro Ser Gly
 195

<210> 35
 <211> 196
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 35

Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Met Leu Arg Gly
 1 5 10 15

10

ES 2 376 586 T3

Glu Met Phe Val Phe Lys Glu Arg Trp Phe Trp Arg Val Arg Asn Asn
 20 25 30

Gln Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Pro Ile Gly Gln Phe Trp Arg Gly
 35 40 45

Leu Pro Ala Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Glu Arg Lys Asp Gly Lys Phe
 50 55 60

Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys His Trp Val Phe Asp Glu Ala Ser Leu
 65 70 75 80

Glu Pro Gly Tyr Pro Lys His Ile Lys Glu Leu Gly Arg Gly Leu Pro
 85 90 95

Thr Asp Lys Ile Asp Ala Ala Leu Phe Trp Met Pro Asn Gly Lys Thr
 100 105 110

Tyr Phe Phe Arg Gly Asn Lys Tyr Tyr Arg Phe Asn Glu Glu Phe Arg
 115 120 125

Ala Val Asp Ser Glu Tyr Pro Lys Asn Ile Lys Val Trp Glu Gly Ile
 130 135 140

Pro Glu Ser Pro Arg Gly Ser Phe Met Gly Ser Asp Glu Val Phe Thr
 145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Lys Phe Asn Asn Gln Lys Leu
 165 170 175

Lys Val Glu Pro Gly Tyr Pro Lys Ser Ala Leu Arg Asp Trp Met Gly
 180 185 190

Cys Pro Ser Gly
 195

<210> 36
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 36

Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Met Leu Arg Gly
 1 5 10 15

5

10

ES 2 376 586 T3

Glu Met Phe Val Phe Lys Glu Arg Trp Phe Trp Arg Val Arg Lys Asn
 20 25 30

Gln Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Pro Ile Gly Gln Phe Trp Arg Gly
 35 40 45

Leu Pro Ala Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Glu Arg Lys Asp Gly Lys Phe
 50 55 60

Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys His Trp Val Phe Asp Glu Ala Ser Leu
 65 70 75 80

Glu Pro Gly Tyr Pro Lys His Ile Lys Glu Leu Gly Arg Arg Leu Pro
 85 90 95

Thr Asp Lys Ile Asp Ala Ala Leu Phe Trp Met Pro Asn Gly Lys Asp
 100 105 110

Tyr Phe Phe Arg Gly Asn Lys Tyr Tyr Arg Phe Asn Glu Glu Leu Arg
 115 120 125

Ala Val Asp Ser Glu Tyr Pro Lys Asn Ile Lys Val Trp Glu Gly Ile
 130 135 140

Pro Glu Ser Pro Arg Gly Ser Phe Met Gly Ser Asp Glu Val Phe Thr
 145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Lys Phe Asn Asn Gln Lys Leu
 165 170 175

Lys Val Glu Pro Gly Tyr Pro Lys Ser Ala Leu Arg Asp Trp Met Gly
 180 185 190

Cys Pro Ser Gly
 195

<210> 37

<211> 196

5 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 37

10 Pro Lys Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Val Phe Arg Gly

ES 2 376 586 T3

1				5						10						15
Glu	Met	Phe	Val	Phe	Lys	Glu	Arg	Trp	Phe	Trp	Arg	Val	Arg	Asn	Asn	
			20					25					30			
Gln	Val	Met	Asp	Gly	Tyr	Pro	Met	Pro	Ile	Gly	Gln	Leu	Trp	Arg	Gly	
		35					40					45				
Leu	Pro	Ala	Ser	Ile	Asn	Thr	Ala	Tyr	Glu	Arg	Lys	Asp	Gly	Lys	Phe	
	50					55					60					
Val	Phe	Phe	Lys	Gly	Asp	Lys	His	Trp	Val	Phe	Asp	Glu	Ala	Ser	Leu	
65					70					75					80	
Glu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Lys	His	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Arg	Gly	Leu	Pro	
				85					90					95		
Thr	Asp	Lys	Ile	Asp	Ala	Ala	Leu	Phe	Trp	Met	Pro	Asn	Gly	Lys	Thr	
			100					105					110			
Tyr	Phe	Phe	Arg	Gly	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Arg	Phe	Asn	Glu	Glu	Leu	Arg	
		115					120					125				
Ala	Val	Asp	Ser	Glu	Tyr	Pro	Lys	Asn	Ile	Lys	Val	Trp	Glu	Gly	Ile	
	130						135					140				
Pro	Glu	Ser	Pro	Arg	Gly	Ser	Phe	Met	Gly	Ser	Asp	Glu	Val	Phe	Thr	
145					150					155					160	
Tyr	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Lys	Tyr	Trp	Lys	Phe	Asn	Asn	Gln	Lys	Leu	
				165					170					175		
Lys	Val	Glu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Lys	Ser	Ala	Leu	Arg	Asp	Trp	Met	Gly	
			180					185					190			
Cys	Pro	Ala	Gly													
			195													

<210> 38
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

5

<400> 38

ES 2 376 586 T3

Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Met Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Glu Met Phe Val Phe Lys Glu Arg Trp Phe Trp Arg Val Arg Asn Asn
 20 25 30

Gln Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Pro Ile Gly Gln Phe Trp Arg Gly
 35 40 45

Leu Pro Ala Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Glu Arg Lys Asp Gly Lys Phe
 50 55 60

Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys His Trp Val Phe Asp Glu Ala Ser Leu
 65 70 75 80

Glu Pro Gly Tyr Pro Lys His Ile Lys Glu Leu Gly Arg Gly Leu Pro
 85 90 95

Thr Asp Lys Ile Asp Ala Ala Leu Phe Trp Met Pro Asn Gly Lys Thr
 100 105 110

Tyr Phe Phe Arg Gly Asn Lys Tyr Tyr Arg Phe Asn Glu Glu Phe Arg
 115 120 125

Ala Val Asp Ser Glu Tyr Pro Lys Asn Ile Lys Val Trp Glu Gly Ile
 130 135 140

Pro Glu Ser Pro Arg Gly Ser Phe Met Gly Ser Asp Glu Val Phe Thr
 145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Lys Phe Asn Asn Gln Lys Leu
 165 170 175

Lys Val Glu Pro Gly Tyr Pro Lys Ser Ala Leu Arg Asp Trp Met Gly
 180 185 190

Cys Pro Ser Gly
 195

- <210> 39
- 5 <211> 196
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 39

ES 2 376 586 T3

Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asp Phe Asp Thr Val Ala Met Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Glu Met Phe Val Phe Lys Gly Arg Trp Phe Trp Arg Val Arg His Asn
 20 25 30

Arg Val Leu Asp Asn Tyr Pro Met Pro Ile Gly His Phe Trp Arg Gly
 35 40 45

Leu Pro Gly Asp Ile Ser Ala Ala Tyr Glu Arg Gln Asp Gly Arg Phe
 50 55 60

Val Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Leu Phe Arg Glu Ala Asn Leu
 65 70 75 80

Glu Pro Gly Tyr Pro Gln Pro Leu Thr Ser Tyr Gly Leu Gly Ile Pro
 85 90 95

Tyr Asp Arg Ile Asp Thr Ala Ile Trp Trp Glu Pro Thr Gly His Thr
 100 105 110

Phe Phe Phe Gln Glu Asp Arg Tyr Trp Arg Phe Asn Glu Glu Thr Gln
 115 120 125

Arg Gly Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Ser Val Trp Gln Gly Ile
 130 135 140

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

Tyr Phe Tyr Lys Gly Thr Lys Tyr Trp Lys Phe Asp Asn Glu Arg Leu
 165 170 175

Arg Met Glu Pro Gly Tyr Pro Lys Ser Ile Leu Arg Asp Phe Met Gly
 180 185 190

Cys Gln Glu His
 195

5 <210> 40
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 40

ES 2 376 586 T3

Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Val Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Glu Met Phe Val Phe Lys Gly Arg Trp Phe Trp Arg Val Arg His Asn
 20 25 30

Arg Val Leu Asp Asn Tyr Pro Met Pro Ile Gly His Phe Trp Arg Gly
 35 40 45

Leu Pro Gly Asn Ile Ser Ala Ala Tyr Glu Arg Gln Asp Gly His Phe
 50 55 60

Val Phe Phe Lys Gly Asn Arg Tyr Trp Leu Phe Arg Glu Ala Asn Leu
 65 70 75 80

Glu Pro Gly Tyr Pro Gln Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Thr Asp Ile Pro
 85 90 95

Tyr Asp Arg Ile Asp Thr Ala Ile Trp Trp Glu Pro Thr Gly His Thr
 100 105 110

Phe Phe Phe Gln Ala Asp Arg Tyr Trp Arg Phe Asn Glu Glu Thr Gln
 115 120 125

His Gly Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Ser Val Trp Gln Gly Ile
 130 135 140

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

Tyr Phe Tyr Lys Gly Thr Lys Tyr Trp Lys Phe Asn Asn Glu Arg Leu
 165 170 175

Arg Met Glu Pro Gly His Pro Lys Ser Ile Leu Arg Asp Phe Met Gly
 180 185 190

Cys Gln Glu His
 195

- <210> 41
- <211> 196
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 41

ES 2 376 586 T3

Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Leu Ala Ile Leu Arg Arg
1 5 10 15

Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Gln Trp Phe Trp Arg Val Arg Asn Asn
20 25 30

Arg Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Gln Ile Thr Tyr Phe Trp Arg Gly
35 40 45

Leu Pro Pro Ser Ile Asp Ala Val Tyr Glu Asn Ser Asp Gly Asn Phe
50 55 60

Val Phe Phe Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Val Phe Lys Asp Thr Thr Leu
65 70 75 80

Gln Pro Gly Tyr Pro His Asp Leu Ile Thr Leu Gly Ser Gly Ile Pro
85 90 95

Pro His Gly Ile Asp Ser Ala Ile Trp Trp Glu Asp Val Gly Lys Thr
100 105 110

Tyr Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Met Lys
115 120 125

Thr Met Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile
130 135 140

Pro Glu Ser Pro Gln Gly Ala Phe Val His Lys Glu Asn Gly Phe Thr
145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Lys Gly Lys Glu Tyr Trp Lys Phe Asn Asn Gln Ile Leu
165 170 175

Lys Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg Ser Ile Leu Lys Asp Phe Met Gly
180 185 190

Cys Asp Gly Pro
195

- <210> 42
- 5 <211> 196
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 42

ES 2 376 586 T3

Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Leu Ala Ile Leu Arg Arg
1 5 10 15

Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Gln Trp Phe Trp Arg Val Arg Asn Asn
20 25 30

Arg Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Gln Ile Thr Tyr Phe Trp Arg Gly
35 40 45

Leu Pro Pro Ser Ile Asp Ala Val Tyr Glu Asn Ser Asp Gly Asn Phe
50 55 60

Val Phe Phe Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Val Phe Lys Asp Thr Thr Leu
65 70 75 80

Gln Pro Gly Tyr Pro His Asp Leu Ile Thr Leu Gly Asn Gly Ile Pro
85 90 95

Pro His Gly Ile Asp Ser Ala Ile Trp Trp Glu Asp Val Gly Lys Thr
100 105 110

Tyr Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Met Lys
115 120 125

Thr Met Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Ile Trp Lys Gly Ile
130 135 140

Pro Glu Ser Pro Gln Gly Ala Phe Val His Lys Glu Asn Gly Phe Thr
145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Lys Gly Lys Glu Tyr Trp Lys Phe Asn Asn Gln Ile Leu
165 170 175

Lys Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg Ser Ile Leu Lys Asp Phe Met Gly
180 185 190

Cys Asp Gly Pro

- 5 <210> 43
- <211> 196
- <212> PRT
- <213> Rattus norvegicus

ES 2 376 586 T3

<400> 43

Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Leu Ala Ile Leu Arg Arg
 1 5 10 15

Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Gln Trp Phe Trp Arg Val Arg Asn Asn
 20 25 30

Arg Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Gln Ile Thr Tyr Phe Trp Arg Gly
 35 40 45

Leu Pro Pro Ser Ile Asp Ala Val Tyr Glu Asn Ser Asp Gly Asn Phe
 50 55 60

Val Phe Phe Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Val Phe Lys Asp Thr Thr Leu
 65 70 75 80

Gln Pro Gly Tyr Pro His Asp Leu Ile Thr Leu Gly Asn Gly Ile Pro
 85 90 95

Pro His Gly Ile Asp Ser Ala Ile Trp Trp Glu Asp Val Gly Lys Thr
 100 105 110

Tyr Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Met Lys
 115 120 125

Thr Met Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Ile Trp Lys Gly Ile
 130 135 140

Pro Glu Ser Pro Gln Gly Ala Phe Val His Lys Glu Asn Gly Phe Thr
 145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Lys Gly Lys Glu Tyr Trp Lys Phe Asn Asn Gln Ile Leu
 165 170 175

Lys Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg Ser Ile Leu Lys Asp Phe Met Gly
 180 185 190

Cys Asp Gly Pro
 195

5

<210> 44

<211> 198

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 44

ES 2 376 586 T3

Pro His Arg Cys Ser Thr His Phe Asp Ala Val Ala Gln Ile Arg Gly
 1 5 10 15

Glu Ala Phe Phe Phe Lys Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu Thr Arg Asp
 20 25 30

Arg His Leu Val Ser Leu Gln Pro Ala Gln Met His Arg Phe Trp Arg
 35 40 45

Gly Leu Pro Leu His Leu Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr Glu Arg Thr
 50 55 60

Ser Asp His Lys Ile Val Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Val Phe
 65 70 75 80

Lys Asp Asn Asn Val Glu Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val Ser Asp Phe
 85 90 95

Ser Leu Pro Pro Gly Gly Ile Asp Ala Ala Phe Ser Trp Ala His Asn
 100 105 110

Asp Arg Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg Tyr Asp Asp
 115 120 125

His Thr Arg His Met Asp Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Ser Pro Leu Trp
 130 135 140

Arg Gly Val Pro Ser Thr Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp Ser Asp Gly
 145 150 155 160

Ala Ser Tyr Phe Phe Arg Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val Leu Asp Gly
 165 170 175

Glu Leu Glu Val Ala Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala Arg Asp Trp
 180 185 190

Leu Val Cys Gly Asp Ser
 195

5 <210> 45
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 45

ES 2 376 586 T3

Pro His Arg Cys Thr Ala His Phe Asp Ala Val Ala Gln Ile Arg Gly
 1 5 10 15

Glu Ala Phe Phe Phe Lys Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu Thr Arg Asp
 20 25 30

Arg His Leu Val Ser Leu Gln Pro Ala Gln Met His Arg Phe Trp Arg
 35 40 45

Gly Leu Pro Leu His Leu Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr Glu Arg Thr
 50 55 60

Ser Asp His Lys Ile Val Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Val Phe
 65 70 75 80

Lys Asp Asn Asn Val Glu Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val Ser Asp Phe
 85 90 95

Ser Leu Pro Pro Gly Gly Ile Asp Ala Val Phe Ser Trp Ala His Asn
 100 105 110

Asp Arg Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg Tyr Asp Asp
 115 120 125

His Thr Arg Arg Met Asp Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Gly Pro Leu Trp
 130 135 140

Arg Gly Val Pro Ser Met Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp Ser Asp Gly
 145 150 155 160

Ala Ser Tyr Phe Phe Arg Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val Leu Asp Gly
 165 170 175

Glu Leu Glu Ala Ala Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala Arg Asp Trp
 180 185 190

Leu Val Cys Gly Glu Pro
 195

5

- <210> 46
- <211> 191
- <212> PRT
- <213> Xenopus laevis

ES 2 376 586 T3

<400> 46

Pro Ser Arg Cys Asp Pro Asn Val Val Phe Asn Ala Val Thr Thr Met
1 5 10 15

Arg Gly Glu Leu Ile Phe Phe Val Lys Arg Phe Leu Trp Arg Lys His
20 25 30

Pro Gln Ala Ser Glu Ala Glu Leu Met Phe Val Gln Ala Phe Trp Pro
35 40 45

Ser Leu Pro Thr Asn Ile Asp Ala Ala Tyr Glu Asn Pro Ile Thr Glu
50 55 60

Gln Ile Leu Val Phe Lys Gly Ser Lys Tyr Thr Ala Leu Asp Gly Phe
65 70 75 80

Asp Val Val Gln Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Tyr Ser Leu Gly Phe Pro
85 90 95

Lys Thr Val Lys Arg Ile Asp Ala Ala Val His Ile Glu Gln Leu Gly
100 105 110

Lys Thr Tyr Phe Phe Ala Ala Lys Lys Tyr Trp Ser Tyr Asp Glu Asp
115 120 125

Lys Lys Gln Met Asp Lys Gly Phe Pro Lys Gln Ile Ser Asn Asp Phe
130 135 140

Pro Gly Ile Pro Asp Lys Ile Asp Ala Ala Phe Tyr Tyr Arg Gly Arg
145 150 155 160

Leu Tyr Phe Phe Ile Gly Arg Ser Gln Phe Glu Tyr Asn Ile Asn Ser
165 170 175

5

Lys Arg Ile Val Gln Val Leu Arg Ser Asn Ser Trp Leu Gly Cys
180 185 190

<210> 47

<211> 190

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

ES 2 376 586 T3

Pro Asp Pro Cys Ser Ser Glu Leu Asp Ala Met Met Leu Gly Pro Arg
 1 5 10 15

Gly Lys Thr Tyr Ala Phe Lys Gly Asp Tyr Val Trp Thr Val Ser Asp
 20 25 30

Ser Gly Pro Gly Pro Leu Phe Arg Val Ser Ala Leu Trp Glu Gly Leu
 35 40 45

Pro Gly Asn Leu Asp Ala Ala Val Tyr Ser Pro Arg Thr Gln Trp Ile
 50 55 60

His Phe Phe Lys Gly Asp Lys Val Trp Arg Tyr Ile Asn Phe Lys Met
 65 70 75 80

Ser Pro Gly Phe Pro Lys Lys Leu Asn Arg Val Glu Pro Asn Leu Asp
 85 90 95

Ala Ala Leu Tyr Trp Pro Leu Asn Gln Lys Val Phe Leu Phe Lys Gly
 100 105 110

Ser Gly Tyr Trp Gln Trp Asp Glu Leu Ala Arg Thr Asp Phe Ser Ser
 115 120 125

Tyr Pro Lys Pro Ile Lys Gly Leu Phe Thr Gly Val Pro Asn Gln Pro
 130 135 140

Ser Ala Ala Met Ser Trp Gln Asp Gly Arg Val Tyr Phe Phe Lys Gly
 145 150 155 160

Lys Val Tyr Trp Arg Leu Asn Gln Gln Leu Arg Val Glu Lys Gly Tyr
 165 170 175

Pro Arg Asn Ile Ser His Asn Trp Met His Cys Arg Pro Arg
 180 185 190

<210> 48

<211> 189

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

ES 2 376 586 T3

Pro Asn Pro Cys Ser Gly Glu Val Asp Ala Met Val Leu Gly Pro Arg
 1 5 10 15

Gly Lys Thr Tyr Ala Phe Lys Gly Asp Tyr Val Trp Thr Val Thr Asp
 20 25 30

Ser Gly Pro Gly Pro Leu Phe Gln Ile Ser Ala Leu Trp Glu Gly Leu
 35 40 45

Pro Gly Asn Leu Asp Ala Ala Val Tyr Ser Pro Arg Thr Arg Arg Thr
 50 55 60

His Phe Phe Lys Gly Asn Lys Val Trp Arg Tyr Val Asp Phe Lys Met
 65 70 75 80

Ser Pro Gly Phe Pro Met Lys Phe Asn Arg Val Glu Pro Asn Leu Asp
 85 90 95

Ala Ala Leu Tyr Trp Pro Val Asn Gln Lys Val Phe Leu Phe Lys Gly
 100 105 110

Ser Gly Tyr Trp Gln Trp Asp Glu Leu Ala Arg Thr Asp Leu Ser Arg
 115 120 125

Tyr Pro Lys Pro Ile Lys Glu Leu Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Pro
 130 135 140

Ser Ala Ala Met Ser Trp Gln Asp Gly Gln Val Tyr Phe Phe Lys Gly
 145 150 155 160

Lys Glu Tyr Trp Arg Leu Asn Gln Gln Leu Arg Val Ala Lys Gly Tyr
 165 170 175

Pro Arg Asn Thr Thr His Trp Met His Cys Gly Ser Gln
 180 185

<210> 49
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Bos Taurus

5

<400> 49

ES 2 376 586 T3

Pro Asp Leu Cys Asp Ser Asn Leu Ser Phe Asp Ala Val Thr Met Leu
1 5 10 15

Gly Lys Glu Leu Leu Leu Phe Arg Asp Arg Ile Phe Trp Arg Arg Gln
20 25 30

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

Pro Gln Leu Met Ser Asn Val Asp Ala Ala Tyr Glu Val Ala Glu Arg
50 55 60

Gly Thr Ala Tyr Phe Phe Lys Gly Pro His Tyr Trp Ile Thr Arg Gly
65 70 75 80

Phe Gln Met Gln Gly Pro Pro Arg Thr Ile Tyr Asp Phe Gly Phe Pro
85 90 95

Arg Tyr Val Gln Arg Ile Asp Ala Ala Val Tyr Leu Lys Asp Ala Gln
100 105 110

Lys Thr Leu Phe Phe Val Gly Asp Glu Tyr Tyr Ser Tyr Asp Glu Arg
115 120 125

Lys Arg Lys Met Glu Lys Asp Tyr Pro Lys Ser Thr Glu Glu Glu Phe
130 135 140

Ser Gly Val Asn Gly Gln Ile Asp Ala Ala Val Glu Leu Asn Gly Tyr
145 150 155 160

Ile Tyr Phe Phe Ser Gly Pro Lys Ala Tyr Lys Ser Asp Thr Glu Lys
165 170 175

Glu Asp Val Val Ser Glu Leu Lys Ser Ser Ser Trp Ile Gly Cys
180 185 190

<210> 50

<211> 191

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

ES 2 376 586 T3

Pro Asp Leu Cys Asp Ser Ser Ser Ser Phe Asp Ala Val Thr Met Leu
 1 5 10 15

Gly Lys Glu Leu Leu Leu Phe Lys Asp Arg Ile Phe Trp Arg Arg Gln
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Met Ser Asn Val Asp Ala Ala Tyr Glu Val Ala Glu Arg
 50 55 60

Gly Thr Ala Tyr Phe Phe Lys Gly Pro His Tyr Trp Ile Thr Arg Gly
 65 70 75 80

Phe Gln Met Gln Gly Pro Pro Arg Thr Ile Tyr Asp Phe Gly Phe Pro
 85 90 95

Arg His Val Gln Gln Ile Asp Ala Ala Val Tyr Leu Arg Glu Pro Gln
 100 105 110

Lys Thr Leu Phe Phe Val Gly Asp Glu Tyr Tyr Ser Tyr Asp Glu Arg
 115 120 125

Lys Arg Lys Met Glu Lys Asp Tyr Pro Lys Asn Thr Glu Glu Glu Phe
 130 135 140

Ser Gly Val Asn Gly Gln Ile Asp Ala Ala Val Glu Leu Asn Gly Tyr
 145 150 155 160

Ile Tyr Phe Phe Ser Gly Pro Lys Thr Tyr Lys Tyr Asp Thr Glu Lys
 165 170 175

Glu Asp Val Val Ser Val Val Lys Ser Ser Ser Trp Ile Gly Cys
 180 185 190

<210> 51
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 51

Pro Asp Leu Cys Asp Ser Ser Ser Ser Phe Asp Ala Val Thr Met Leu

ES 2 376 586 T3

Gly Lys Glu Leu Leu Phe Phe Arg Asp Arg Ile Phe Trp Arg Arg Gln
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Met Ser Asn Val Asp Ala Ala Tyr Glu Val Ala Asp Arg
 50 55 60

Gly Met Ala Tyr Phe Phe Lys Gly Pro His Tyr Trp Ile Thr Arg Gly
 65 70 75 80

Phe Gln Met Gln Gly Pro Pro Arg Thr Ile Tyr Asp Phe Gly Phe Pro
 85 90 95

Arg Tyr Val Gln Arg Ile Asp Ala Ala Val His Leu Lys Asp Thr Gln
 100 105 110

Lys Thr Leu Phe Phe Val Gly Asp Glu Tyr Tyr Ser Tyr Asp Glu Arg
 115 120 125

Lys Arg Lys Met Asp Lys Asp Tyr Pro Lys Asn Thr Glu Glu Glu Phe
 130 135 140

Ser Gly Val Asn Gly Gln Ile Asp Ala Ala Val Glu Leu Asn Gly Tyr
 145 150 155 160

Ile Tyr Phe Phe Ser Gly Pro Lys Ala Tyr Lys Tyr Asp Thr Glu Lys
 165 170 175

Glu Asp Val Val Ser Val Leu Lys Ser Asn Ser Trp Ile Gly Cys
 180 185 190

<210> 53
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53

Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly
 1 5 10 15

Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn
 20 25 30

5

10

ES 2 376 586 T3

Arg Val Gln Glu Gly Tyr Pro Met Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys Gly
35 40 45

Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe
50 55 60

Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val
65 70 75 80

Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro
85 90 95

Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr
100 105 110

Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg
115 120 125

Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile
130 135 140

Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Thr
145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys Leu
165 170 175

Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly
180 185 190

Cys Asn Gln Lys
195

<210> 54
<211> 196
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 54

Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly
1 5 10 15

Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn
20 25 30

10

ES 2 376 586 T3

Arg Val Gln Glu Gly Tyr Pro Met Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys Gly
 35 40 45

Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe
 50 55 60

Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val
 65 70 75 80

Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro
 85 90 95

Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr
 100 105 110

Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg
 115 120 125

Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile
 130 135 140

Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Thr
 145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys Leu
 165 170 175

Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly
 180 185 190

Cys Lys Gln Lys
 195

<210> 55
 <211> 196
 5 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 55

Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly
 1 5 10 15

10 Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn

ES 2 376 586 T3

			20					25						30			
Arg	Val	Gln	Glu	Gly	Tyr	Pro	Met	Gln	Ile	Glu	Gln	Phe	Trp	Lys	Gly		
		35					40					45					
Leu	Pro	Ala	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Tyr	Glu	Arg	Ala	Asp	Gly	Arg	Phe		
	50					55					60						
Val	Phe	Phe	Lys	Gly	Asp	Lys	Tyr	Trp	Val	Phe	Lys	Glu	Val	Thr	Val		
65					70					75					80		
Glu	Pro	Gly	Tyr	Pro	His	Ser	Leu	Gly	Glu	Leu	Gly	Ser	Cys	Leu	Pro		
				85					90					95			
Arg	Glu	Gly	Ile	Asp	Thr	Ala	Leu	Arg	Trp	Glu	Pro	Val	Gly	Lys	Thr		
			100					105						110			
Tyr	Phe	Phe	Lys	Gly	Glu	Arg	Tyr	Trp	Arg	Tyr	Ser	Glu	Glu	Arg	Arg		
		115					120					125					
Ala	Thr	Asp	Pro	Gly	Tyr	Pro	Lys	Pro	Ile	Thr	Val	Trp	Lys	Gly	Ile		
	130					135					140						
Pro	Gln	Ala	Pro	Gln	Gly	Ala	Phe	Ile	Ser	Lys	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Thr		
145					150					155					160		
Tyr	Phe	Tyr	Lys	Gly	Arg	Asp	Tyr	Trp	Lys	Phe	Asp	Asn	Gln	Lys	Leu		
				165					170					175			
Ser	Val	Glu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Arg	Asn	Ile	Leu	Arg	Asp	Trp	Met	Gly		
			180					185					190				
Cys	Lys	Gln	Lys														
			195														

<210> 56
 <211> 198
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 56

Pro	Asp	Arg	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Asp	Ala	Ile	Ala	Asn	Ile	Arg	Gly
1				5					10					15	

10

ES 2 376 586 T3

Glu Thr Phe Phe Phe Lys Gly Pro Trp Phe Trp Arg Leu Gln Pro Ser
 20 25 30

Gly Gln Leu Val Ser Pro Arg Pro Ala Arg Leu His Arg Phe Trp Glu
 35 40 45

Gly Leu Pro Ala Gln Val Arg Val Val Gln Ala Ala Tyr Ala Arg His
 50 55 60

Arg Asp Gly Arg Ile Leu Leu Phe Ser Gly Pro Gln Phe Trp Val Phe
 65 70 75 80

Gln Asp Arg Gln Leu Glu Gly Gly Ala Arg Pro Leu Thr Glu Leu Gly
 85 90 95

Leu Pro Pro Gly Glu Glu Val Asp Ala Val Phe Ser Trp Pro Gln Asn
 100 105 110

Gly Lys Thr Tyr Leu Val Arg Gly Arg Gln Tyr Trp Arg Tyr Asp Glu
 115 120 125

Ala Ala Ala Arg Pro Asp Pro Gly Tyr Pro Arg Asp Leu Ser Leu Trp
 130 135 140

Glu Gly Ala Pro Pro Ser Pro Asp Asp Val Thr Val Ser Asn Ala Gly
 145 150 155 160

Asp Thr Tyr Phe Phe Lys Gly Ala His Tyr Trp Arg Phe Pro Lys Asn
 165 170 175

Ser Ile Lys Thr Glu Pro Asp Ala Pro Gln Pro Met Gly Pro Asn Trp
 180 185 190

Leu Asp Cys Pro Ala Pro
 195

<210> 57

<211> 193

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

10 Phe Asp Ala Ile Thr Val Asp Arg Gln Gln Gln Leu Tyr Ile Phe Lys
 1 5 10 15

ES 2 376 586 T3

Gly Ser His Phe Trp Glu Val Ala Ala Asp Gly Asn Val Ser Glu Pro
 20 25 30

Arg Pro Leu Gln Glu Arg Trp Val Gly Leu Pro Pro Asn Ile Glu Ala
 35 40 45

Ala Ala Val Ser Leu Asn Asp Gly Asp Phe Tyr Phe Phe Lys Gly Gly
 50 55 60

Arg Cys Trp Arg Phe Arg Gly Pro Lys Pro Val Trp Gly Leu Pro Gln
 65 70 75 80

Leu Cys Arg Ala Gly Gly Leu Pro Arg His Pro Asp Ala Ala Leu Phe
 85 90 95

Phe Pro Pro Leu Arg Arg Leu Ile Leu Phe Lys Gly Ala Arg Tyr Tyr
 100 105 110

Val Leu Ala Arg Gly Gly Leu Gln Val Glu Pro Tyr Tyr Pro Arg Ser
 115 120 125

Leu Gln Asp Trp Gly Gly Ile Pro Glu Glu Val Ser Gly Ala Leu Pro
 130 135 140

Arg Pro Asp Gly Ser Ile Ile Phe Phe Arg Asp Asp Arg Tyr Trp Arg
 145 150 155 160

Leu Asp Gln Ala Lys Leu Gln Ala Thr Thr Ser Gly Arg Trp Ala Thr
 165 170 175

Glu Leu Pro Trp Met Gly Cys Trp His Ala Asn Ser Gly Ser Ala Leu
 180 185 190

Phe

- <210> 58
- <211> 191
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 58

Pro Ser Gln Glu Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu
 1 5 10 15

10

ES 2 376 586 T3

His Phe Ala Met Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu
 20 25 30

Leu Phe Trp Gly Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile
 35 40 45

Ser Arg Asp Trp His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala
 50 55 60

Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Lys
 65 70 75 80

Lys Gln Arg Phe Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg
 85 90 95

Gly His Ser Arg Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Ala
 100 105 110

Thr Trp Leu Ser Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn
 115 120 125

Asn Tyr Asp Asp Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu
 130 135 140

Pro Ile Gln Ser Val Phe Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val
 145 150 155 160

Asn Leu Arg Thr Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg
 165 170 175

Ser Ile Ala Gln Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu
 180 185 190

<210> 59
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 59

Pro Ser Gln Glu Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu
 1 5 10 15

ES 2 376 586 T3

His Phe Ala Leu Leu Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asn Ile Phe Glu Leu
 20 25 30

Leu Phe Trp Gly Arg Ser Ser Asp Gly Ala Arg Glu Pro Gln Phe Ile
 35 40 45

Ser Arg Asn Trp His Gly Val Pro Gly Lys Val Asp Ala Ala Met Ala
 50 55 60

Gly Arg Ile Tyr Val Thr Gly Ser Leu Ser His Ser Ala Gln Ala Lys
 65 70 75 80

Lys Gln Lys Ser Lys Arg Arg Ser Arg Lys Arg Tyr Arg Ser Arg Arg
 85 90 95

Gly Arg Gly His Arg Arg Ser Gln Ser Ser Asn Ser Arg Arg Ser Ser
 100 105 110

Arg Ser Ile Trp Phe Ser Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Gly Leu Gly
 115 120 125

Thr Tyr Asn Asn Tyr Asp Tyr Asp Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr
 130 135 140

Cys Glu Pro Ile Gln Ser Val Tyr Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr
 145 150 155 160

Arg Val Asn Leu Arg Thr Arg Arg Val Asp Ser Val Asn Pro Pro Tyr
 165 170 175

Pro Arg Ser Ile Ala Gln Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Thr Ser Glu Lys
 180 185 190

<210> 60
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

5

<400> 60

Pro Ser Arg Glu Glu Cys Glu Gly Ser Ser Pro Ser Asp Val Phe Ala
 1 5 10 15

His Phe Ala Leu Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Arg Leu
 20 25 30

10

ES 2 376 586 T3

Leu Phe Trp Ser His Ser Phe Gly Gly Ala Ile Glu Pro Arg Val Ile
 35 40 45

Ser Gln Asp Trp Leu Gly Leu Pro Glu Gln Val Asp Ala Ala Met Ala
 50 55 60

Gly Gln Ile Tyr Ile Ser Gly Ser Ala Leu Lys Pro Ser Gln Pro Lys
 65 70 75 80

Met Thr Lys Ser Ala Arg Arg Ser Gly Lys Arg Tyr Arg Ser Arg Arg
 85 90 95

Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly His Ser Arg Ser Gln Lys Ser His Arg
 100 105 110

Gln Ser Arg Ser Thr Trp Leu Pro Trp Phe Ser Ser Glu Glu Thr Gly
 115 120 125

Pro Gly Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Tyr Lys Met Asp Trp Leu Val Pro
 130 135 140

Ala Thr Cys Glu Pro Ile Gln Ser Val Tyr Phe Phe Ser Gly Glu Glu
 145 150 155 160

Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Arg Thr Gln Arg Val Asp Thr Val Thr Pro
 165 170 175

Pro Tyr Pro Arg Ser Ile Ala Gln Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Val Pro
 180 185 190

Asp Gln Lys
 195

<210> 61
 <211> 188
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 61

Pro Ser Gln Glu Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu
 1 5 10 15

His Phe Ala Met Leu His Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Lys Leu

ES 2 376 586 T3

			20					25				30				
Leu	Phe	Trp	Gly	Arg	Pro	Ser	Gly	Gly	Ala	Arg	Gln	Pro	Gln	Phe	Ile	
		35					40					45				
Ser	Arg	Asp	Trp	His	Gly	Val	Pro	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Ala	Met	Ala	
	50					55					60					
Gly	Arg	Ile	Tyr	Ile	Ser	Gly	Leu	Thr	Pro	Ser	Pro	Ser	Ala	Lys	Lys	
65					70					75					80	
Gln	Lys	Ser	Arg	Arg	Arg	Ser	Arg	Lys	Arg	Tyr	Arg	Ser	Arg	Tyr	Gly	
				85					90					95		
Arg	Gly	Arg	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	Arg	Leu	Ser	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	
			100					105					110			
Leu	Trp	Phe	Ser	Ser	Glu	Glu	Val	Ser	Leu	Gly	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Glu	
		115					120					125				
Asp	Tyr	Glu	Thr	Ser	Trp	Leu	Lys	Pro	Ala	Thr	Ser	Glu	Pro	Ile	Gln	
	130					135					140					
Ser	Val	Tyr	Phe	Phe	Ser	Gly	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Arg	Val	Asn	Leu	Arg	
145					150					155					160	
Thr	Gln	Arg	Val	Asp	Thr	Val	Asn	Pro	Pro	Tyr	Pro	Arg	Ser	Ile	Ala	
				165					170					175		
Gln	Tyr	Trp	Leu	Gly	Cys	Pro	Ala	Pro	Gly	Gly	Gln					
			180					185								

<210> 62
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Separador de visualización de ribosomas

10

<400> 62

ES 2 376 586 T3

```

gctggctctg gagctggtgc aggctctggt gctggcgcag gttctggcgc tggtgctggt      60
tctggcactg gtgcttctcc ggcagctgtt ccggcagcgg ttccagcage ggtgccggca      120
gcagttcctg ctgCGGTGGG cgaaggagaa ggagaaggcg agggagaggg cgaaggatac      180
ccgtacgacg taccggacta cgccgaaggt ggtggtggct ccgagcagaa gctcatctcc      240
gaagaagacc tggagggtgg tggTGGTCC acagactaca aggacgacga cgacaaatcc      300
caaatcaaac gaaaggccca gtcgaaaaac tgggcctttc gattt                          345
5
<210> 63
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
10
<220>
<223> PEX2forw
<400> 63
15 atgcctgaaa tctgcaaaca gg 22
<210> 64
<211> 54
<212> ADN
20 <213> Artificial
<220>
<223> PEXR4
25 <220>
<221> característica misc
<222> (25)..(26)
<223> n es a, c, g ó t
30 <220>
<221> característica misc
<222> (28)..(29)
<223> n es a, c, g, ó t
35 <400> 64
cctgcaaaga acacagcttt ctmnmnnt ggggcctcgt ataccgcatc aatc 54
<210> 65
<211> 42
40 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> PEXF4
45 <400> 65
ggaccctggc ttcccaagc tcatcgaga tgcttgaat gc 42
<210> 66
50 <211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
55 <220>
<223> PEX2rev

```

ES 2 376 586 T3

<400> 66
ggagctcgct cgagtcagc 19

5 <210> 67
<211> 60
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> PEXF1

<400> 67
gagaaagctg tgttcttgc agggaatgaa tactggatct actcagcgag cacctggag 60

15 <210> 68
<211> 60
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> PEXR1

<220>
<221> característica misc
25 <222> (29)..(30)
<223> n is a, c, g, or t
<220>
<221> característica misc
<222> (35)..(36)
30 <223> n es a, c, g, ó t

<400> 68
gagcttgggg aagccagggt ccatttmnn cttmnnctcg ttgacctcc agaactgtc 60

35 <210> 69
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> PEXR3

<220>
<221> característica misc
45 <222> (37)..(38)
<223> n es a, c, g, ó t

<400> 69
ggcagtcgga ggctagtcag tggttggga taaccmnnct ccaaggtgct cgctgag 57

50 <210> 70
<211> 52
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> PEXR2

<220>
60 <221> característica misc
<222> (23)..(24)
<223> n es a, c, g, ó t

<220>
65 <221> misc_feature
<222> (26)..(27)

ES 2 376 586 T3

<223> n es a, c, g, ó t

<220>

5 <221> característica misc
<222> (29)..(30)
<223> n es a, c, g, ó t

<400> 70
10 gccagcgaag atgtatgtct tmnmnmnmn gctccagtta aaggctgcat cc 52

<210> 71
<211> 60
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> PEXF2

<400> 71
20 ctgactagcc tcggactgcc ccctgatgtt caacgtgtgg atgcagcctt taactggagc 60

<210> 72
<211> 55
<212> ADN
25 <213> Artificial

<220>
<223> T7P_PEX2

30 <400> 72
gtttaacttt aagaaggaga tatacatatg cctgaaatct gcaaacagga tatcg 55

<210> 73
<211> 49
35 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> PEX2_RD

40 <400> 73
cctgcaccag ctccagagcc agcgcagcct agccagtcgg atttgatgc 49

<210> 74
45 <211> 186
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
50 <223> T7Pg10epsilon

<400> 74

ggatgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg gcgcccgtga tgccggccac 60

gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga aattaatacg actcactata 120

gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga aggagatata 180

catatg 186

55 <210> 75
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 376 586 T3

<220>
 <223> T7Pfor
 5 <400> 75
 ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagc 27
 <210> 76
 <211> 23
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> R1A
 15 <400> 76
 aaatcgaaag gccagttt tcg 23
 <210> 77
 <211> 55
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> cebador puente
 <400> 77
 gtttaacttt aagaaggaga tatacatatg cctgaaatct gcaaacagga tatcg 55
 30 <210> 78
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> cebador puente
 <400> 78
 40 gtcgttcaga ccacgaccct cgatgcagcc tagccagtcg gatttgatgc 50
 <210> 79
 <211> 243
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> T7PAviTagFXa
 50 <400> 79
 ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg gcgccggtga tgccggccac 60
 gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga aattaatcg actcactata 120
 gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga aggagatata 180
 catatgggtc ttaatgatat ttttgaagct cagaaaatcg aatggcacga aatcgagggt 240
 cgt 243
 <210> 80
 <211> 332
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 376 586 T3

<220>
 <223> T7T

<400> 80

5 taggaagctc agaaaatcga atggcacgaa taatgagctc ccgggagcgc ttggagccac 60
 ccgcagttcg aaaaaataata agggcctccc actgactgct cttctgtcag tgggctactc 120
 ctggactcgg caccagattg cctcattttt ctctcttggc attttgtata aatccacctt 180
 gactggggaa attctctctgg ggtcaggtgg caccagcctg gatccggctg ctaacaaagc 240
 ccgaaaggaa gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa taactagcat aacccttgg 300
 ggctctaaa cgggtcttga ggggtttttt gc 332

10 <210> 81
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> T7Trev

<400> 81

20 gcaaaaaacc cctcaagacc cgtttagagg 30

<210> 82
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> T7Pfor

30 <400> 82
 ggtgatgtcg gcgatatagg cg 22

<210> 83
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> NdeI-PEX2for

40 <400> 83
 ctgagagtgc accatagcc tgaatctgc aacagg 37

<210> 84
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> EcoRI-PEX2rev

50 <400> 84
 ccatgattac gaattcgag cctagccagt cgg 33

55 <210> 85
 <211> 38
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> anti ssrA-oligonucleótido
 5 <400> 85
 ttaagctgct aaagcgtagt tttcgtcgtt tgcgacta 38
 <210> 86
 10 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador RT
 <400> 86
 cagagcctgc accagctcca gagccagc 28
 20 <210> 87
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador F1
 <400> 87
 30 gtttaacttt aagaaggaga tatacatatg 30
 <210> 88
 <211> 210
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de consenso – Xaa indica un guión (-)
 40 <220>
 <221> característica misc
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 45 <220>
 <221> característica misc
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 50 <220>
 <221> característica misc
 <222> (55)..(57)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (97)..(97)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (119)..(120)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 65 <220>

ES 2 376 586 T3

<221> misc_feature

<222> (189)..(195)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

5

<400> 88

Pro Glu Ile Cys Lys Gln Asp Ile Val Phe Asp Gly Ile Ala Gln Ile
1 5 10 15

Arg Gly Glu Xaa Ile Phe Phe Phe Lys Asp Arg Phe Ile Trp Arg Thr
20 25 30

Val Xaa Thr Pro Arg Asp Lys Pro Met Gly Pro Leu Leu Val Ala Thr
35 40 45

Phe Trp Pro Glu Leu Pro Xaa Xaa Xaa Glu Lys Ile Asp Ala Val Tyr
50 55 60

Glu Ala Pro Gln Glu Glu Lys Ala Val Phe Phe Ala Gly Asn Glu Tyr
65 70 75 80

Trp Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Glu Arg Gly Tyr Pro Lys Pro Leu
85 90 95

Xaa Thr Ser Leu Gly Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg Val Asp Ala Ala
100 105 110

Phe Asn Trp Ser Lys Asn Xaa Xaa Lys Lys Thr Tyr Ile Phe Ala Gly
115 120 125

Asp Lys Phe Trp Arg Tyr Asn Glu Val Lys Lys Lys Met Asp Pro Gly
130 135 140

Phe Pro Lys Leu Ile Ala Asp Ala Trp Asn Ala Ile Pro Asp Asn Leu
145 150 155 160

Asp Ala Val Val Asp Leu Gln Gly Gly Gly His Ser Tyr Phe Phe Lys
165 170 175

Gly Ala Tyr Tyr Leu Lys Leu Glu Asn Gln Ser Leu Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Lys Ser Val Lys Phe Gly Ser Ile Lys Ser Asp Trp Leu
195 200 205

Gly Cys
210

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para identificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une específicamente a una molécula diana predeterminada de una biblioteca de ADN, **caracterizado porque** dicho método comprende las etapas de
- a) seleccionar la secuencia del identificador de secuencia nº:2
 - b) preparar una biblioteca de ADN de la secuencia seleccionada en la cual al menos está alterada una posición de aminoácido según la tabla V;
 - 10 c) cribar en la biblioteca de ADN preparada los polipéptidos que se unen específicamente a una molécula diana predeterminada;
 - d) seleccionar el ácido nucleico que codifica uno de los elementos con capacidad de unión específica de la etapa c);
 - e) repetir las etapas b) a d) entre dos y cinco veces; y
 - 15 f) aislar dicho ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une específicamente a una molécula diana predeterminada.
2. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la biblioteca de ADN comprende elementos de expresión lineal.
- 20 3. Método, según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** los miembros de la biblioteca del polipéptido se expresan mediante presentación en ribosomas.
4. Método, según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** los miembros de la biblioteca del polipéptido se expresan mediante presentación en bacteriófagos.
- 25