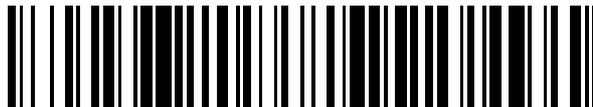


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 040**

51 Int. Cl.:

C12N 9/68 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2008** **E 08857923 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014** **EP 2220221**

54 Título: **Plasmina modificada de forma recombinante**

30 Prioridad:

29.11.2007 US 991148 P

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

16.04.2015

73 Titular/es:

**GRIFOLS THERAPEUTICS INC. (100.0%)
4101 Research Commons, 79 T.W. Alexander
Drive
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

NOVOKHATNY, VALERY

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 534 040 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

Plasmina modificada de forma recombinante

5 **Antecedentes de la invención**

El plasminógeno humano es una proteína de cadena sencilla que contiene 791 residuos de aminoácido. La activación de plasminógeno a plasmina resulta de una escisión sencilla del enlace peptídico Arg561-Val562 en el zimógeno. La molécula de plasmina resultante es una serina proteasa enlazada con disulfuro, de dos cadenas con especificidad tipo tripsina (escisión después de Lys y Arg).

La cadena pesada amino-terminal de plasmina (residuos 1-561, ~60 kDa) se compone de cinco dominios kringle, cada uno conteniendo aproximadamente 80 residuos de aminoácido. Los dominios kringle son responsables de las propiedades reguladoras de plasminógeno, tal como interacción con inhibidores de activación, por ejemplo, iones Cl^{-1} ; con estimuladores de activación, por ejemplo, ácido ϵ -aminocaproico con células mamíferas y bacterianas; y con otras proteínas, tales como el de sustrato fisiológico de plasmina, fibrina y el inhibidor de plasmina $\alpha 2$ -antiplasmina. De todos los cinco kringles, el kringle 1 es uno de los más multi-funcionales: su actividad de unión a lisina se ha mostrado que es responsable de interacción de plasmina con $\alpha 2$ -anti-plasmina y fibrina. Véase, Wiman, B., y otros, Biochim. Biophys. Acta 579:142-154 (1979); y Lucas, M.A., y otros, J. Biol. Chem. 258:4249-4256 (1983).

La cadena ligera C-terminal de la plasmina (residuos 562-791, ~25kDa) es una serina proteasa típica, homóloga a tripsina y que contiene la triada catalítica serina proteasa clásica: His603, Asp646 y Ser741. El plasminógeno contiene 24 puentes de hidrógeno y 2 sitios de glicosilación en Asn289 y Thr346.

La proteólisis limitada de plasminógeno por medio de la elastasa ha mostrado que resulta en tres fragmentos principales (Sottrup- Jensen, L., y otros, Prog. Chem. Fibrinol. Thrombol. 3:191-209 (1978)). El primer fragmento, K1-3, incluye los primeros tres kringles y se pueden aislar en dos versiones, Tyr80-Val338 y Tyr80-Val354. El segundo fragmento, K4, corresponde al cuarto kringle e incluye residuos Val355-Ala440. El último fragmento C-terminal (el denominado miniplasminógeno) incluye residuos Val443-Asn791 y consiste del quinto kringle y el dominio serina proteasa. El miniplasminógeno se puede activar de la misma manera que plasminógeno, formando miniplasminógeno.

Debido a la compleja estructura de la molécula del plasminógeno de longitud completa, los sistemas de expresión bacteriana no han demostrado su utilidad para la producción del plasminógeno recombinante. El plasminógeno se produce en la forma de cuerpos de inclusión insolubles y no es replegable de ese estado. Además, la expresión de plasminógeno en células de mamífero se complica por la activación intracelular de plasminógeno en plasmina y la citotoxicidad resultante. La producción de plasminógeno completamente activo utilizando células de insecto es posible, sin embargo, este sistema no es adecuado para la producción a gran escala debido al bajo rendimiento. Además, como con cualquier régimen de la proteína recombinante, existe la posibilidad de encontrarse con problemas de inmunogenicidad en el sujeto receptor de la proteína recombinante terapéutica.

La inmunogenicidad puede ser un obstáculo para la utilización efectiva y/o eficiente de determinados regímenes terapéuticos de proteína recombinante. La inmunogenicidad es una compleja serie de respuestas a una sustancia (por ejemplo, la estructura química de una proteína que incluye la secuencia de aminoácidos) que se percibe como extraño y puede incluir la producción de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes, la formación de complejos inmunes, la activación del complemento, la activación de mastocitos, inflamación y anafilaxis. La inmunogenicidad puede limitar la eficacia y seguridad de una proteína terapéutica en múltiples formas. La eficacia se puede reducir directamente por la formación de anticuerpos neutralizantes. La eficacia también se puede reducir indirectamente, como la unión a cualquiera de los anticuerpos neutralizantes o no neutralizantes por lo general conduce a la rápida eliminación del suero. Los efectos secundarios graves e incluso la muerte pueden ocurrir cuando una reacción inmune surge. Una clase especial de efectos secundarios se produce cuando los anticuerpos neutralizantes reaccionan de forma cruzada con una proteína endógena y bloquean su función.

En consecuencia, una proteína modificada recombinante, que posee las características deseables (por ejemplo, regiones con estructuras químicas tipo nativo) de plasmina/plasminógeno mientras que carece de ciertas características negativas y es capaz de la producción en sistemas de expresión de proteína recombinante incluyendo células bacterianas en cantidades considerables, es deseable.

La solicitud de patente PCT WO 2007/047874 A dio a conocer delta-plasminógeno, un plasminógeno mutante por delección en el que se elimina la parte media de la molécula, aunque la molécula resultante es diferente a las de la presente invención.

5 **La otra parte, Medynski D. y otros** (Medynski, y otros "Replegamiento, purificación y activación de miniplasminógeno aislado de cuerpos de inclusión de *E. coli*" ("Refolding, purification, and activation of miniplasminogen and microplasminogen isolated from *E. Coli* inclusion bodies") Protein Expression and Purification, Academic Press, San Diego, CA, vol. 52, no. 2, 26 de octubre de 2006, páginas 395-402) **dan a conocer el replegamiento, purificación, y activación de plasminógeno aislado de cuerpos de inclusión de *E. Coli*.**

Características de la invención

10 En un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene:

a) un dominio único kringle N-terminal homólogo a un dominio kringle del plasminógeno humano nativo, en el que los últimos cuatro residuos de aminoácidos en el dominio kringle son V, P, Q y C; y

15 b) un sitio de activación de dominio C-terminal y dominio de la serina proteasa homólogos a los dominios correspondientes en plasminógeno humano; en los que el polipéptido se une a la lisina inmovilizada **y es capaz de activarse a enzimas de plasmina funcionales después de un suceso de activación que implica, como mínimo, la escisión proteolítica de un enlace peptídico Arg-Val localizado entre el dominio kringle y el dominio proteasa.**

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido **codificado por el polinucleótido anterior.**

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende **el** polinucleótido de la presente invención. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1.

25 En algunos aspectos, la presente invención proporciona una célula cultivada que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 1. En otra realización, la célula cultivada es un organismo procariótico. En una realización, el organismo procariótico es *E. coli*.

30 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para la fabricación de uno o más polipéptidos recombinantes de plasmina que **tienen extremos N-terminales** diferentes. El método comprende:

a) proporcionar el polipéptido **anterior**

35 b) poner en contacto el polipéptido proporcionado en la etapa a) con una proteasa en condiciones suficientes para romper uno o más enlaces peptídicos para formar de esta manera el uno o más polipéptidos de plasmina recombinantes que **tienen extremos N-terminales** diferentes. En una realización, proporcionar comprende expresar un cuadro de lectura abierta con una secuencia correspondiente a la secuencia tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1, o una variante degenerada de la misma, en un huésped adecuado. En otra realización, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2.

DESCRIPCION BREVE DE LOS DIBUJOS

45 La figura 1 es una representación esquemática de la plasmina nativa después de la activación por escisión proteolítica. K1-K5 son regiones kringle 1-5; y SP es el dominio de la serina proteasa. " α 2-AP" es el sitio de unión α 2-antiplasmina en el kringle 1.

La figura 2 es una representación esquemática de un mutante de supresión de plasminógeno de la presente invención utilizando la misma nomenclatura como en la figura 1, y mostrando la supresión del K2-5.

50 La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de plasminógeno humano, mostrando la secuencia líder de 19-residuo numerada como -19 a -1, y la secuencia de plasminógeno se muestra como residuos 1-791 (ver SEQ ID NO: 3, la secuencia de ADNc para plasminógeno humano, y SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos codificada, tal como se muestra en la figura 3). Se muestran una serie de características se muestran, entre ellas las siguientes: una realización de la (TAL6003)-secuencia del plasminógeno (sombreada); dominios kringle 1-5 (doble subrayado); sitios de glicosilaciones Asn289 y Thr346 (en negrita); el sitio de activación de Arg-Val (R561-V562 en negritas); y los sitios de unión de lisina en kringle 1 (en subrayado y con la numeración de posición específica).

60 La figura 4 muestra la comparación de secuencias polipeptídicas (es decir, una alineación de abertura) entre los cinco dominios kringle (1-5) de la plasmina o plasminógeno humanos nativos. Residuos de aminoácidos que son idénticos a los de la misma posición relativa en kringle 1 se muestran en subrayado.

La figura 5 muestra un gradiente del 8-25% de SDS-PAGE de preparación plasmina derivada de plasma (carril 1 = no reducido (NR); Carril 2 = reducido (R)) y (TAL6003)-plasmina (carril 3 = no reducido (NR); Carril 4 = reducido (R)). La activación de estreptoquinasa del plasminógeno derivado de plasma y (TAL6003)-plasminógeno en plasmina nativa y recombinante (TAL6003)-plasmina, respectivamente, da lugar a la formación de dos bandas correspondientes a las kringle y los dominios de la serina proteasa. En consecuencia, después de la incubación con el agente reductor ditioneitol (DTT) antes de electroforesis, la plasmina derivada de plasma y (TAL6003)-plasmina, que son una sola banda en un gel no reducido, se reducen a dos bandas correspondientes a kringle 1 (banda inferior) y el dominio de la serina proteasa (banda superior) en el mismo gel no reducido.

La figura 6 es una representación gráfica de la activación de (TAL6003)-plasminógeno por estreptoquinasa.

La figura 7 es un cromatograma que muestra la unión de (TAL6003)-plasminógeno a lisina-sefarosa 4B: 0,5 mg de (TAL6003)-plasminógeno purificado se aplica en la columna de lisina-sefarosa 4B (1x3 cm) equilibrada con solución salina tamponada con Tris, pH 7,4. La proteína unida es eluida de la columna por un gradiente de 0-20 mM de ácido ϵ -aminocaproico (ϵ -ACA) como un solo pico. La absorbancia a 280 nm y la concentración de ϵ -ACA, como una función del volumen de efluentes se presentan en el gráfico.

La figura 8 muestra la unión de (TAL6003)-plasminógeno a la fibrina según la evaluación de su activación posterior por tPA y la consiguiente lisis del coágulo.

La figura 9 muestra una comparación *in vitro* de la eficacia trombolítica de (TAL6003)-plasmina con plasmina derivado de plasma.

La figura 10 muestra el patrón de unión de disulfuro de (TAL6003)-plasmina (SEQ ID NO: 2). En la figura, (X) representa la secuencia de aminoácidos RDVVLFEK.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los presentes inventores han descubierto nuevos polipéptidos del plasminógeno recombinante, o variantes de los mismos, en lo sucesivo denominado (TAL6003)-plasminógenos que tienen características tipo plasminógeno nativo a pesar de la supresión de 4 kringles de su estructura. Estos (TAL6003)-plasminógenos, o variantes de los mismos, son zimógenos que son capaces de llegar a ser activados a las enzimas de plasmina funcionales (en adelante denominados (TAL6003)-plasminas) después de un evento de activación que, como mínimo, implica una escisión proteolítica del enlace peptídico Arg-Val situado entre el dominio kringle y el dominio serina proteasa del zimógeno.

El (TAL6003)-plasmina(plasminógeno), o una variante del mismo, de la presente invención tiene unión de fibrina y antiplasmina así como las propiedades de activación de plasminógeno humano nativo de longitud completa. Además, el (TAL6003)-plasminógeno tiene una serie de características novedosas y deseables incluyendo la expresión de alto nivel en la producción recombinante y ciertas estructuras químicas de proteínas idénticas o muy similares a las formas naturales del plasminógeno derivado de plasma humano.

El (TAL6003)- plasmina(plasminógeno), de acuerdo con la presente invención se puede caracterizar, como mínimo, por lo siguiente:

i) los pesos moleculares más bajos (por ejemplo, en una realización aproximadamente 36,911 a aproximadamente 37,039 Da) de (TAL6003)-plasminas creados después de activación de (TAL6003)-plasminógenos, da como resultado un aumento de la actividad específica (por mg de proteína);

ii) la falta, como mínimo, de dos sitios de glicosilación encontrados en la proteína nativa (véase la figura 3, es decir, N289 y T346), combinado con los pesos moleculares relativamente bajos, facilita la producción recombinante de esta proteína utilizando sistemas de expresión de bacterias y levaduras relativamente baratos;

iii) (TAL6003)-plasminógenos se pueden activar por los activadores del plasminógeno tPA, uroquinasa, y estreptoquinasa;

iv) la presencia del único dominio N-terminal kringle homólogo a un dominio kringle del plasminógeno humano nativo conserva las propiedades de unión de fibrina de la plasmina que son importantes para la eficacia trombolítica;

v) la presencia de sitios de unión α 2-antiplasmina en el dominio kringle único N-terminal homólogo a un dominio kringle del plasminógeno humano nativo permite a las (TAL6003)-plasminas inhibirse rápidamente por este inhibidor fisiológico de la plasmina (una característica que puede prevenir el sangrado);

vi) el menor tamaño de las (TAL6003)-plasminas puede facilitar su inhibición por α 2-macroglobulina, disminuyendo además la posibilidad de complicaciones hemorrágicas en relación con plasmina nativa. En realizaciones particulares, la ausencia de kringle 5, que mantiene el sitio principal de unión para fibrina (fibrinógeno) intacto, sin digerir, puede permitir la utilización de las (TAL6003)-plasminas con la reducción reducida de fibrinógeno circulante;

vii) la presencia de un solo dominio N-terminal kringle homólogo a un dominio kringle del plasminógeno humano nativo, en el que los últimos cuatro residuos de aminoácidos en el dominio kringle son V, P, Q y C, proporciona un enlace tipo nativo al dominio de la serina proteasa (es decir, un enlace similar a la unión de dominio de origen natural entre el dominio kringle 5 y el dominio de la serina proteasa del plasminógeno humano), y

5 viii) después de la expresión del (TAL6003)-plasminógeno recombinante, su extremo N-terminal puede ser escindido de nuevo (por ejemplo, escindido de nuevo durante la activación) para proporcionar un extremo N-terminal tipo nativo.

En general, la presente invención proporciona polipéptidos (TAL6003)-plasmina(plasminógeno) recombinantes con una sola región kringle N-terminal al sitio de activación y el dominio de la serina proteasa, con ciertas ventajas respecto a miniplasmina(plasminógeno). Aunque los (TAL6003)-plasminógenos de la presente invención sólo tienen un dominio kringle, como tal, N-terminales al sitio de activación, algunas realizaciones incluyen secuencias adicionales N-terminales al sitio de activación. Secuencias adicionales N-terminales se pueden derivar de aquellas de las regiones kringle nativas de plasminógenos.

15 Los dominios kringle N-terminales de la presente invención incluyen secuencias kringle de kringles 1 y 4 de plasmina(plasminógeno) nativo y equivalentes funcionales del mismo. En particular, véase la discusión de abajo que ofrece una guía sobre la preservación de la función en las variantes de polipéptidos, incluyendo la preservación de los residuos que participan o tienen influencia en la unión de lisina.

20 Además, realizaciones particulares de los polipéptidos de la presente invención pueden mostrar inmunogenicidad reducida en virtud de las estructuras tipo nativo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el plasminógeno recombinante de la presente invención tiene un extremo N-terminal idéntico a aquel de una de las formas naturales del plasminógeno derivado de plasma humano, que al activarse por la estreptoquinasa, produce polipéptidos de plasmina que comprenden extremos N-terminales tipo nativos. Además, los polipéptidos novedosos de la presente invención tienen una secuencia entre los dominios Kringle y serina proteasa que son similares a la unión entre Kringle 5 y el dominio SP en plasmina humana de origen natural.

Definiciones

30 Los términos "dominio" y "región" de un polipéptido son generalmente sinónimos tal como se utiliza en el presente documento, a menos que se indique lo contrario. Cuando se recita junto con las estructuras bien reconocidas o denominaciones funcionales, tales como "kringle" o "serina proteasa", etc., dichos términos introducirán un aspecto de polipéptido relativo a, como mínimo, alguna o algunas características comúnmente reconocidas y entendidas por asociarse con las estructuras de polipéptido correspondientes a dichas designaciones.

35 Una "célula huésped cultivada", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula procarionota o eucariota que contiene ADN heterólogo que se ha introducido en la célula por cualquier medio, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, microinyección, transformación, infección viral y lo similar.

40 "Heteróloga" como se utiliza en el presente documento significa "de origen natural diferente" o que representa un estado no natural. Por ejemplo, si una célula huésped cultivada se transforma con un ADN o gen derivado de otro organismo, en particular de otra especie, dicho gen es heterólogo con respecto a esa célula huésped cultivada y también con respecto a los descendientes de la célula huésped cultivada que llevan ese gen. Del mismo modo, "heteróloga" se refiere a una secuencia de nucleótidos derivada e insertada en el mismo tipo de célula original, natural pero que está presente en un estado no natural, por ejemplo, un número de copia diferente o bajo el control de diferentes elementos reguladores. Además, cuando se utiliza en el contexto de un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos, el término "heteróloga" también puede referirse a cualquier región de la secuencia que es de un origen natural diferente que otra región de la misma secuencia. Por ejemplo, si una proteína recombinante comprende un dominio kringle derivado de la apolipoproteína(a) y un dominio de serina-proteasa derivado de plasminógeno, el dominio kringle y el dominio serina proteasa son "heteróloga" respecto a uno con otro, particularmente si cada dominio se deriva de una especie diferente o de un organismo.

Una molécula "vector" es una molécula de ácido nucleico en la que el ácido nucleico heterólogo se puede insertar, la cual luego puede ser introducida en una célula huésped cultivada apropiada. Los vectores de preferencia tienen uno o varios orígenes de replicación, y uno o más sitios en los que el ADN recombinante se puede introducir. Vectores suelen tener medios convenientes por los cuales las células con vectores se pueden seleccionar de aquellos que no tienen, por ejemplo, codifican genes de resistencia a los fármacos. Entre los vectores comunes se incluyen los plásmidos, genomas virales, y (principalmente en levadura y bacterias) "cromosomas artificiales."

60 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "secuencia de control transcripcional" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos, como las secuencias de iniciador, secuencias intensificadoras y secuencias promotoras, lo que induce,

reprime o controla de otra forma la transcripción de las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína a las cuales se enlazan operativamente.

El término "polipéptido" se utiliza indistintamente en este documento con los términos "péptido" y "proteína".

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se utilizan indistintamente en este documento, y pueden referirse a cualquier ácido nucleico que contiene la información necesaria para los fines indicados por el contexto. Es decir, el ácido nucleico puede ser ADN o ARN, ya sea de cadena sencilla o doble cadena, u otro ácido nucleico, siempre y cuando el polímero sea capaz de representar la información adecuada, por ejemplo, en relación con un péptido codificado, y puede incluir secuencias complementarias, por ejemplo, cadenas sentido y cadenas anti-sentido de polímeros de ácidos nucleicos.

El término "variante" de un polipéptido se refiere a una secuencia de aminoácidos que se altera por uno o más aminoácidos. La variante puede tener cambios "conservadores", en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, la sustitución de leucina con isoleucina. Alternativamente, una variante puede tener cambios "no conservadores", por ejemplo, la sustitución de una glicina con un triptófano. Una variación análoga menor también puede incluir supresión o inserción de aminoácidos, o ambas. Una forma particular de un polipéptido "variante" es un polipéptido "funcionalmente equivalente", es decir, un polipéptido que presenta actividad sustancialmente similar *in vivo* o *in vitro* como en los ejemplos del polipéptido de la invención, tal como se describe más detalladamente a continuación. La guía en la determinación de cuales residuos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar o suprimir sin eliminar la actividad biológica o inmunológica se puede encontrar mediante los programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Además, a continuación, se proporcionan guías específicas, incluyendo las proporcionadas dentro de las referencias citadas que se incorporan plenamente en la presente para referencia.

Los términos "N-terminal" y "C-terminal" se emplean en el presente documento para designar la posición relativa de cualquier secuencia de aminoácidos o dominio de polipéptido o estructura a la cual se aplican. La posición relativa será evidente a partir del contexto. Es decir, una característica "N-terminal" se encontrará por lo menos más cerca al extremo N-terminal de la molécula de polipéptido que otra característica discutida en el mismo contexto (la otra característica posible referida como "C-terminal" para la primera característica). Del mismo modo, los términos "5'" y "3'" se pueden utilizar en el presente documento para denominar posiciones relativas de características de polinucleótidos.

Los polipéptidos a los que se hace referencia en el presente documento como que tienen un dominio N-terminal "homólogo a un dominio kringle de plasminógeno humano nativo" presentan características estructurales y funcionales similares a los dominios kringle nativo de plasminógeno. Además, los polipéptidos a los que se hace referencia en el presente documento tienen un dominio N-terminal "homólogo a kringle 1" presentan características similares al kringle 1 nativo, como mínimo, en el grado en que los polipéptidos pueden tener una mayor afinidad por los ácidos ω -aminocarboxílicos (y homólogos funcionales tales como el ácido *trans*-4-aminometilciclohexano-1-carboxílico, un ácido cíclico) que kringle 5. Véase, por ejemplo, Chang, Y., y otros, *Biochemistry* 37:3258-3271 (1998), incorporada en la presente como referencia, para condiciones y protocolos para la comparación de unión de polipéptidos aislados de dominio kringle a ácido 5-aminopentanoico (5-APnA), ácido 6-aminohexanoico (6-AHxA), también conocido como ácido ϵ -aminocaproico (ϵ ACA), ácido 7-aminoheptanoico (7-AHpA), y el ácido *trans*-4-aminometilciclohexano-1-carboxílico (t-AMCHA).

Las referencias a los dominios kringle "homólogo al kringle 4" se definen del mismo modo, como se ha señalado anteriormente en relación con la frase "homólogo a kringle 1." Es decir, que presentan características funcionales similares a kringle 4 de plasminógeno nativo humano como se discutió anteriormente. Estos polipéptidos también unen lisina inmovilizada como se describe anteriormente.

Los polipéptidos de la invención unen lisina inmovilizada. Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "unión a lisina inmovilizada" significa que los polipéptidos caracterizados son retardados en su progreso en relación con miniplasminógeno cuando se somete a cromatografía en columna utilizando lisina-sefariosa como medios cromatográficos. Por lo general, los polipéptidos de la invención se pueden eluir de tales medios cromatográficos (resinas de afinidad de lisina) con soluciones que contienen el ligando específico, por ejemplo, ϵ -ACA, como agentes de elución.

Por otra parte, además de Chang y otros, *supra*, se puede consultar otras referencias se puede consultar por aquellos con conocimientos en la técnica para determinar qué residuos pueden ser modificados por la sustitución conservadora o no conservadora, supresión o adición para producir un mutante por supresión en el alcance de la presente invención. Por ejemplo, las referencias siguientes proporciona información sobre residuos particulares de los dominios kringle nativos que pueden ser importantes para la unión de los ácidos ω aminocarboxílicos: Patente de E.E.U.U. No. 6.538.103 a Ji, y

5 otros; patente de E.E.U.U. No. 6.218.517 para Suzuki; Douglas, J.T., y otros, *Biochemistry* 41 (10):3302-10 (2002); Zajicek, J., y otros, *J. Mol. Biol.* 301 (2):333-47 (2000); Lee, H., y otros., *Arch Biochem Biophys.*, 375(2):359-63 (2000); Castellino, F. y S. McCance, *Ciba Found Symp.* 212:46-60 (1997); McCance, S., y otros, *J. Biol. Chem.*, 269:32405-32410 (1994); Rejante, M.R. y M. Llinas, *Eur. J. Biochem.*, 221(3):939-49 (1994); Wu, T.P., y otros, *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 5(2):157-66 (1994); Hoover, C.J., y otros, *Biochemistry*, 32(41):10936-43 (1993); Menhart, N., y otros, *Biochemistry*, 32:8799-8806 (1993); Thewes, T., y otros, *J. Biol. Chem.*, 265 (7):3906-3915 (1990); Novokhatny, V., y otros, *Thromb Res.*, 53(3):243-52 (1989); Motta, A., y otros, *Biochemistry*, 26(13):3827-36 (1987); Novokhatny, V., y otros, *J. Mol. Biol.*, 179:215-232 (1984); Lerch, P.G., y otros, *Eur. J. Biochem.*, 107(l):7-13 (1980); Sottrup-Jensen, L., y otros, *Prog. Chem. Fibrinol. Thrombol.*, 3:191-209 (1978); y Wiman, B. and D. Collen, *Nature* 272, 549-545 (1978), todas incorporadas en el presente documento como referencia en su totalidad.

15 Debido a que los presentes inventores han reconocido que una molécula de plasmina (plasminógeno) simplificada, valiosa se puede preparar con un solo dominio kringle N-terminal que tiene características funcionales ventajosas (que se pueden evaluar, en parte, mediante el análisis de la unión de lisina inmovilizado como se describe en el presente documento), la presente invención puede abarcar otros dominios de unión de fibrina o regiones N-terminal hasta el sitio de activación. Por ejemplo, la invención puede incluir polipéptidos en el que el dominio de la proteasa de serina de la plasmina se une a un kringle de unión a fibrina seleccionado de un grupo que incluye, pero sin limitación a los mismos, el kringle 4 del plasminógeno humano, el kringle 2 de tPA, o un kringle de la apolipoproteína (a). Además, la invención puede incluir polipéptidos en donde un dominio de la proteasa de serina de la plasmina se une a cualquier otro módulo de unión a fibrina conocido, como el dominio "dedo" de tPA o fibronectina, o el fragmento FAB de IgG específica de fibrina.

25 En algunos aspectos, los polipéptidos de la presente invención tienen una estructura química de proteínas (por ejemplo, N-terminal tipo nativo y unión de tipo nativa entre el kringle y el dominio de la serina proteasa) que son idénticas a las estructuras químicas que se encuentran en la forma natural del plasminógeno derivado de plasmina (plasminógeno) humano. Sin confiarse a una teoría particular, se cree que ciertas características de una proteína pueden contribuir a su inmunogenicidad, incluyendo pero sin limitación a la misma, a su secuencia de aminoácidos. En consecuencia, la presente invención proporciona una proteína terapéutica eficaz basada en (TAL6003)-plasminógeno recombinante al reducir de manera preferente la inmunogenicidad potencial de (TAL6003)-plasminógeno mediante la incorporación de secuencias de aminoácidos que se asemejan a las secuencias nativas de plasminógeno humano.

35 En un aspecto, el polipéptido recombinante (TAL6003)-plasminógeno de la presente invención comprende a) un único dominio N-terminal kringle homólogo a un dominio kringle del plasminógeno humano nativo, en donde los últimos cuatro residuos de aminoácidos en el dominio kringle son V, P, Q y C, y b) un sitio de activación de dominio C-terminal y dominio de la serina proteasa homólogo a los dominios correspondientes en plasminógeno humano; en donde el polipéptido se une a la lisina inmovilizada **y es capaz de activarse a enzimas de plasmina funcionales después de un suceso de activación que implica, como mínimo, la escisión proleolítica de un enlace peptídico Arg-Val lozalizado entre el dominio kringle y el dominio serina proteasa.**

40 Los polipéptidos (TAL6003)-plasminógeno recombinante de la presente invención pueden ser activados por aquellos con conocimientos comunes en la técnica para proporcionar un polipéptido (TAL6003)-plasmina. En una realización, el polipéptido (TAL6003)-plasmina muestra actividad fibrinolítica que es inhibida por la $\alpha 2$ -antiplasmina a una velocidad de inhibición que es por lo menos aproximadamente 5 veces más rápida que la velocidad de inhibición de la actividad fibrinolítica plasmina de miniplasmina mediante $\alpha 2$ -antiplasmina.

45 En algunas realizaciones, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, y sustituciones conservadoras de la misma. En otras realizaciones, el polipéptido tiene un residuo de arginina en una posición relativa similar a aquella de la posición 85 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

50 Por ejemplo, el (TAL6003)-plasminógeno descrito en la presente invención utiliza modificaciones de residuos de aminoácidos a la región de unión que se une al dominio kringle único y el dominio de la serina proteasa. En consecuencia, esta unión entre los dos dominios más de cerca se asemeja a la unión de origen natural entre el dominio kringle 5 y el dominio de la serina proteasa del plasminógeno humano.

55 En otra realización, el (TAL6003)-plasminógeno descrito en la presente invención comprende además una secuencia N-terminal tipo nativa. El (TAL6003)-plasminógeno producido de manera recombinante puede ser escindido en la activación para proporcionar polipéptidos recombinantes (TAL6003)-plasmina también teniendo un extremo N-terminal tipo nativo.

60 En realizaciones particulares, los residuos en determinadas posiciones del dominio único kringle N-terminal de (TAL6003)-plasminógeno se conservan en relación con kringle 1 del plasminógeno humano nativo. Estos pueden ser los

residuos en las posiciones asociadas con puente de disulfuro y unión de lisina, e incluyen Cys84, Cys105, Cys133, Cys145, Cys157 y Cys162 y Pro136-Pro140, Pro143-Tyr146 y Arg153-Tyr156, respectivamente (posiciones numeradas tal como se muestra en Figura 3). Además, realizaciones particulares de la invención se pueden caracterizar químicamente por el contrario a las miniplasminas(plasminógenos) que tienen una composición de dominio análogo (es decir, kringle serina proteasa (K-SP) (véase Sottrup-Jensen, L., y otros, Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, vol. 3, (Eds; J.F. Davidson, y otros) Raven Press, New York (1978)) pero, entre otras cosas, carece de una arginina (Arg) en una posición relativa similar a aquella de la posición 85 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el (TAL6003)-plasminógeno de la invención comprende un único dominio kringle N-terminal que incluye un residuo de Arg en una posición relativa similar a aquella de la posición 85 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2. Ejemplos no limitativos de una posición relativa similar a aquella de la posición 85 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 incluyen posiciones Arg (153), Arg(234), Arg(324), y Arg(426) de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4.

La caracterización del dominio kringle único N-terminal de (TAL6003)-plasminógeno como "N-terminal" significa solo que el dominio está presente N-terminal respecto al sitio de activación y no significa que los residuos de aminoácidos adicionales N-terminal al dominio en sí no están presentes. Además, el número y la identidad de residuos interpuestos entre el residuo de cisteína C-terminal principal del dominio kringle único N-terminal (es decir, el residuo Cys más C-terminal mostrado en la Figura 4) y el sitio de activación del plasminógeno pueden ser variados sin desviarse del alcance de la presente invención. Una persona con experiencia en la técnica será capaz de determinar estas variaciones que logran los beneficios de la invención (unión tipo kringle 1 de los ácidos ω aminocarboxílicos, sin un aumento sustancial en el tamaño de la supresión mutante o introducción de sitios de glicosilación potencialmente problemáticos) sin indebida experimentación basada en la descripción en este documento y las referencias citadas en este documento para la guía con respecto a la función de kringle 1 y su estructura.

En consecuencia, la invención se refiere a polinucleótidos, polipéptidos, métodos recombinantes para producir los polipéptidos, vectores que contienen los polinucleótidos, sistemas de expresión para la producción de polipéptidos y células huésped cultivadas que comprenden estos sistemas de expresión.

Como se ha señalado, en un aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica el polipéptido descrito en este documento o un polipéptido con sustituciones de aminoácidos conservadoras del mismo. La guía sobre la selección de sustituciones de aminoácidos "conservadoras" se presenta en más detalle a continuación. En una realización, el polinucleótido es el ADN.

En otro aspecto, la invención se refiere a las células que contienen, como mínimo, un polinucleótido de la invención.

En una realización, el polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2.

Polinucleótidos

Los polinucleótidos de la invención incluyen variantes que tienen sustituciones, supresiones y/o adiciones que pueden implicar uno o más nucleótidos. Las variantes pueden ser alteradas en regiones codificantes y no codificantes, o ambas. Las alteraciones en las regiones codificantes pueden producir sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, supresiones o adiciones. Especialmente preferentes entre estas son las sustituciones, adiciones y supresiones silenciosas, que no alteran las propiedades y actividades de la proteína (TAL6003)-plasmina(plasminógeno) o partes de ella. También especialmente preferentes en este sentido son las sustituciones conservadoras (véase más adelante).

En una realización, la molécula de ácido nucleico de la presente invención comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante degenerada de la misma.

Desde luego, técnicas tradicionales de biología molecular, microbiología, y ácido nucleico recombinante también se pueden utilizar para producir los polinucleótidos de la invención. Estas técnicas son bien conocidas y se explican en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel, ed., Vols. I, II y III (1997); Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); DNA Cloning: A Practical Approach, D. N. Glover, ed., Vols. I y II (1985); Oligonucleotide Synthesis, M. L. Gait, ed. (1984); Nucleic Acid Hybridization, Hames and Higgins, eds. (1985); Transcription and Translation, Hames and Higgins, eds. (1984); Animal Cell Culture, R. I. Freshney, ed. (1986); Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press (1986); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning"; the series, Methods in Enzymology, Academic Press, Inc. (1984); Gene Transfer

Vectors for Mammalian Cells, J. H. Miller and M. P. Calos, eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); y Methods in Enzymology, Wu and Grossman and Wu, eds., respectivamente, Vols. 154 y 155, todos incorporados en el presente documento para referencia.

5 Vectores y células huésped cultivadas

La presente invención también se refiere a vectores que incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención, las células huésped cultivadas que son genéticamente diseñadas con vectores recombinantes, y la producción de los polipéptidos (TAL6003)-plasmin(plasminógeno) por técnicas recombinantes.

Construcciones recombinantes se pueden introducir en células huésped cultivadas usando técnicas bien conocidas tales como infección, transducción, transfección, transvección, electroporación y transformación. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, plásmido, vector viral o retroviral. Vectores retrovirales pueden ser competentes en la replicación o defectuosos en la replicación. En el último caso, la propagación viral generalmente ocurrirá solamente en células huésped cultivadas complementariamente.

Los polinucleótidos se pueden unir a un vector que contiene un marcador que se puede seleccionar para la propagación en un huésped cultivado. Generalmente, un vector de plásmido se introduce en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, se puede empaquetar *in vitro* usando una línea celular empacada apropiada y, a continuación, se transduce en células huésped cultivadas.

Son preferidos vectores que comprenden regiones de control que actúan en cis para el polinucleótido de interés. Factores de transactivación apropiados se pueden suministrar por la célula huésped, suministrar por un vector complementario o suministrar por el mismo vector en la introducción en el huésped cultivado.

En ciertas realizaciones en este respecto, los vectores se proporcionan para expresión específica, los cuales pueden ser inducibles y/o específicos de tipo celular. Entre dichos vectores particularmente preferidos son aquellos inducibles por factores ambientales que son fáciles de manipular, tal como la temperatura y aditivos nutrientes.

Vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores cromosómicos, episomales y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriofago, episomas de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus tales como baculovirus, virus de papova, virus vaccinia, adenovirus, virus de viruela aviar, virus de pseudorabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos tal como cósmidos y fagémidos.

Insertos de ADN se deben enlazar operativamente a un promotor apropiado, tal como promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp y tac de *E. coli*, los promotores tempranos y tardíos de SV40 y promotores de LTR retrovirales, por nombrar algunos. Otros promotores adecuados serán conocidos para una persona experta en la materia. Los constructos de expresión además contendrán sitios para iniciación de la transcripción, terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión de ribosoma para la traducción. La porción de codificación de los transcritos maduros expresados por los constructos pueden incluir una traducción en el comienzo y un codón de terminación (UAA, UGA, o UAG) colocado apropiadamente en el final del polipéptido a ser traducido.

Como se indica, los vectores de expresión preferentemente incluirán, como mínimo, un marcador que se puede seleccionar. Dichos marcadores incluyen dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para cultivo celular eucariótico y genes de resistencia a tetraciclina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Ejemplos representativos de huéspedes cultivados apropiados incluyen, pero sin limitación a los mismos, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tal como células de levadura; células de insecto tal como células *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales tales como CHO, COS y células de melanoma de Bowes; y células vegetales. Medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huésped cultivadas descritas anteriormente son conocidos en la técnica.

Entre los vectores preferidos para la utilización en bacterias incluyen, por ejemplo, pET24b o pET22b disponible de Novagen, Madison, WI (pET-24b(+)) y pET-22b(+)) = pET Sistema de expresión 24b (No. de Cat. 69750) y 22b (Cat. No. 70765), respectivamente, EMD Biosciences, Inc., Novagen Brand, Madison, WI; véase la sección de información del producto con respecto a pET-24b y pET-22b para detalles con respecto al vector) pQE70, pQE60 y pQE-9, disponible de Qiagen Inc., Valencia, CA; vectores pBS, vectores PHAGESCRIPT, vectores BLUESCRIPT, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponible de Stratagene, La Jolla, CA; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia (ahora Pfizer, Inc., New York, NY). Entre los vectores eucarióticos preferidos se encuentran pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponible de Pharmacia. Otros vectores adecuados serán fácilmente aparentes para los expertos en la materia.

Promotores bacterianos adecuados para la utilización en la presente invención incluyen los promotores *lac1* y *lacZ* de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor *gpt*, los promotores lambda PR y PL y el promotor *trp*. Promotores eucarióticos adecuados incluyen el promotor temprano intermedio CMV, el promotor de timidina quinasa HSV, los promotores SV40 temprano y tardío, los promotores de LTR retrovirales, tal como aquellos del virus de sarcoma Rous (RSV) y promotores de metalotioneína, tal como el promotor de metalotioneína-I de ratón.

La introducción de un constructo de vector en la célula huésped cultivada se puede efectuar por transfección de fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, infección u otros métodos. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, tal como Davis y otros, *Basic Methods In Molecular Biology*, 2a edición (1995).

La transcripción del ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención por eucariotas más altas se puede incrementar por la inserción de una secuencia intensificadora en el vector. Intensificadores son elementos que actúan en cis de ADN, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 pb que actúan para incrementar la actividad transcripcional de un promotor en un tipo de célula huésped cultivada. Ejemplos de intensificadores incluyen el intensificador SV40, que se localiza en el lado tardío del origen de replicación en bp 100 a 270, el intensificador del promotor temprano de citomegalovirus, el intensificador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, e intensificadores de adenovirus.

Para la secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el ambiente extracelular, las señales de secreción apropiadas se pueden incorporar en el polipéptido expresado. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

El polipéptido se puede expresar en forma modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no solamente señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, se pueden añadir al N-término, por ejemplo, el polipéptido para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula huésped cultivada, durante la purificación, o durante el manejo y almacenamiento consecutivo. También, se pueden añadir fracciones de péptido al polipéptido para facilitar la purificación. Dichas regiones se pueden eliminar antes de la preparación final del polipéptido. La adición de fracciones de péptido a polipéptidos para engendrar la secreción o excreción, para mejorar la estabilidad y para facilitar la purificación, entre otros, son técnicas familiares y de rutina en la materia. Una proteína de fusión preferente comprende una región heteróloga de inmunoglobulina que es útil para solubilizar las proteínas. Por ejemplo, EP 0 464 533 A1 (Contraparte canadiense, 2,045,869) describe las proteínas de fusión que comprenden varias porciones de región constante de moléculas de inmunoglobulina junto con otra proteína humana o parte de ésta. En muchos casos, la parte Fc en una proteína de fusión es perfectamente ventajosa para la utilización en terapia y diagnóstico y de esta manera resulta, por ejemplo, en propiedades farmacocinéticas mejoradas. Por otra parte, para algunos usos puede ser deseable que sea capaz de eliminar la parte Fc después de que la proteína de fusión se ha expresado, detectado y purificado de la manera ventajosa descrita. Este es el caso en el que la porción Fc prueba ser un obstáculo para la utilización en terapia y diagnóstico, por ejemplo cuando la proteína de fusión se utiliza como antígeno para inmunizaciones. En descubrimiento de fármacos por ejemplo, las proteínas humanas se han fusionado con porciones Fc para el propósito de ensayos de cribado de alto rendimiento (tal como receptor hIL5, para identificar antagonistas de hIL-5). Véase, Bennett, D., y otros, *J. Molecular Recognition*, 8:52-58(1995) y Johanson, K. y otros, *J. Biol. Chem.*, 270(16): 9459-9471 (1995).

(TAL6003)-plasminógeno se puede recuperar y purificar a partir de los cultivos celulares recombinantes por métodos bien conocidos que incluyen aquellos específicamente descritos en los ejemplos en el presente documento. Polipéptidos de la presente invención incluyen productos purificados naturalmente, productos de procedimientos sintéticos químicos, y productos producidos por técnicas recombinantes de un huésped cultivado procariótico o eucariótico, que incluye, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, vegetales más altas, de insectos y de mamíferos. Además, polipéptidos de la invención también pueden incluir un residuo de metionina modificado inicial, en algunos casos como un resultado de procedimientos mediados por huésped.

También se contempla que los polipéptidos útiles en la producción de "polipéptidos aislados" de la invención se pueden producir por métodos sintéticos de fase sólida. Véase Houghten, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52:5131-5135 (1985); Patente de E.E.U.U. No. 4.631.211 para Houghten y otros (1986).

Los polipéptidos de la presente invención se pueden proporcionar en una forma aislada. Por "polipéptido aislado" se destina un polipéptido apartado de su ambiente nativo. De esta manera, un polipéptido producido y/o contenido dentro de una célula huésped cultivada recombinante se considera aislado para propósitos de la presente invención. También se destina como un "polipéptido aislado" a polipéptidos que han sido purificados, parcialmente o sustancialmente, de un huésped cultivado recombinante.

EJEMPLOS

Diseño del vector de expresión

5 La secuencia de aminoácidos para (TAL6003)-plasminógeno se muestra en SEQ ID NO: 2. En un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica (TAL6003)-plasminógeno se optimizaron los codones por la expresión de *E. coli* y la estabilidad de ARNm para proporcionar la secuencia de ADN tal como se muestra en SEQ ID NO: 1. Este polinucleótido se clonó en los sitios NdeI y BamHI del vector de expresión de *E. coli* pET24b(+) (Novagen; Madison, WI) para producir la proteína citosólica.

10 Como se ilustra en la tabla 1, la expresión en bacterias (por ejemplo *E. coli*) proporciona un polipéptido (TAL6003)-plasminógeno recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2 (es decir, un (TAL6003)-plasminógeno recombinante con una metionina N-terminal (es decir, M1) que precede inmediatamente el residuo de aminoácidos de arginina (es decir, R2) correspondiente a la arginina en la posición 70 (es decir, R70) de la secuencia de aminoácidos de plasminógeno humano nativo mostrado en SEQ ID NO: 4 (véase también, por ejemplo, la Figura 3). Dicho producto recombinante es susceptible a escisión adicional para producir proteínas adicionales que tienen extremos N-terminales diferentes que incluyen una proteína con una lisina N-terminal (es decir, K10) o valina (es decir, V11) correspondiente, respectivamente, a la lisina en la posición 78 (es decir, K78) o la valina en la posición 79 (es decir, V79) de plasminógeno humano nativo.

20

Tabla 1: Extremos N-terminales de plasmína(plasminógeno) nativo (por ejemplo, basado en SEQ ID NO:4) y (TAL6003)-plasmína(plasminógeno) (por ejemplo, basado en SEQ ID NO: 2, o su variante)	
Plasminógeno nativo que comprende una secuencia lectora de 19 aminoácidos (por ejemplo basado en SEQ ID NO: 4):	
$M^{-19}EHKE \dots E^{01}PLDDY \dots M^{69}R^{70}DVVLFEEKK^{78}V^{79}YLSEC$	
"Lys-plasminógeno" nativo (es decir, escisión de secuencia lectora):	
$E^{01}PLDDY \dots M^{69}R^{70}DVVLFEEKK^{78}V^{79}YLSEC \dots$ <p>(véase SEQ ID NO:5)</p>	
Especies de plasmína nativa posibles basadas en escisión, si es cualquiera, de Lys-Plasminógeno:	
(véase SEQ ID NO: 14)	$M^{69}R^{70}DVVLFEEKK^{78}V^{79}YLSEC \dots$
(véase SEQ ID NO: 13)	$K^{78}V^{79}YLSEC \dots$
(véase SEQ ID NO: 12)	$V^{79}YLSEC \dots$
Polipéptidos de (TAL6003)-plasminógeno recombinantes de la presente invención: (por ejemplo, basados en SEQ ID NO: 2)	
$M^{01}R^{02}DVVLFEEKK^{10}V^{11}YLSEC \dots$	
Proteínas adicionales basadas en escisión adicional de un (TAL6003)-plasminógeno (por ejemplo, basadas en SEQ ID NO: 2)	
(véase SEQ ID NO: 11) $K^{10}V^{11}YLSEC \dots$ (SEQ ID NO: 5) $V^{11}YLSEC \dots$	
↓ indica sitios de escisión potencial	

Expresión y purificación de (TAL6003)-plasminógeno

25 El vector de expresión que comprende el ADN que codifica (TAL6003)-plasminógeno se transforma en una variedad de células que incluyen BL21(DE3)RIL (Stratagene, La Jolla, CA), BL21(DE3) (genotipo: F⁺ompT hsdS_B (r_B m_B⁻) gal dcm (DE3)) (EMB Biosciences, Inc., San Diego, CA), y BLR(DE3) (genotipo: F⁺ampT hsdSB (r_B m_B⁻) gal dcm (DE3) Δ(srl-recA)306::Tn10(TetR)), y la sobreexpresión de proteína seguida por la inducción por IPTG 1mM (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) se analizó por SDS-PAGE. Los estimados de expresión fueron, como mínimo, de

30

La célula tipo BL21(DE3)RIL se diseña para expresar ARNt de *E. coli* raros que codifican para Arg, Ile, y Leu. Además, tanto BL21(DE3) como BLR(DE3) son cepas B de *E. coli* que se clasifican como no patogénicas para humanos y animales basados en la ausencia de factores de virulencia y colonización. Las células BLR(DE3) carecen del gen recA para recombinación de ADN, y no se ha informado de la inducción de fago lambda con estas células. Un banco celular

buscado de constructo (TAL6003)-plasminógeno en células BLR(DE3) se produce y se ensaya su pureza, identidad, e inducción del bacteriófago en Charles River Laboratories (Malvern, PA). El análisis confirmó la identidad y pureza del banco celular buscado y las células pasaron la prueba de inducción de fago sin fago observado (datos no mostrados).

- 5 La producción de (TAL6003)-plasminógeno (es decir, basado en SEQ ID NO:2) se confirma en la expresión a gran escala en la cual las células se lisaron y tanto la proteína soluble como los cuerpos de inclusión purificados se examinaron por SDS-PAGE.

El siguiente protocolo típico se ha usado para la expresión de (TAL6003)-plasminógeno:

- 10 Una colonia sencilla de células de *E. coli* (por ejemplo, BL21(DE3) RIL, BL21(DE3) o BLR(DE3) que contiene el vector de (TAL6003)-plasminógeno se utilizó para inocular 5 ml de LB/canamicina (30 µg/ml) y se incubó durante 8 horas a 37°C en un agitador. A continuación se tomó, una alícuota de 50 µl de la suspensión bacteriana cultivada para el crecimiento adicional en medio fresco. El procedimiento se repitió después de 16 horas con 6 ml de cultivo bacteriano y 250 ml del medio. Los cultivos se hicieron crecer a 37°C con agitación a un OD₆₀₀ nm de ~1,0, y se añadió IPTG a concentración final de 1mM. Los cultivos se hicieron crecer durante otras 5 horas adicionales. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 5.000 x g y sedimentos celulares se disolvieron en Tris pH 8,0 20 mM que contenía EDTA 20 mM y se congelaron a -80°C.

- 20 Para purificar (TAL6003)-plasminógeno, las suspensiones celulares se descongelaron y se añadió tampón hasta que el volumen de solución fue de aproximadamente 1/20 del volumen de cultivo celular original. Después de esto, se añadió lisozima hasta una concentración final de 0,5 mg/ml y las células se agitaron rápidamente a 4°C durante 10 - 15 minutos. A continuación, se añadió Triton X-100 al 1% de la concentración final y la agitación continua durante otros 10 minutos. Se añadieron ADNasa I (0,05 mg/ml) y MgCl₂ (2,5 mM) y la agitación se continuó a 4°C durante 30 minutos o hasta que la solución no era viscosa. La solución final se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 15,000 x g y se desechó el sobrenadante.

- 30 El sedimento celular se lavó tres veces con solución de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 que contenía EDTA 10 mM, Triton-X-100 al 1%, y urea 0,5 M), y el sedimento final se disolvió en 40 ml de tampón de extracción (PBS, pH 7,4 que contenía EDTA 10 mM, DTT 20 mM, y guanidina-HCl 6M) y se almacenó a 4°C durante toda la noche. Después de 16 horas, la solución se centrifugó durante 30 minutos a 15.000 x g para eliminar los sólidos y el sobrenadante se añadió lentamente a la solución de replegado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, guanidina-HCl 3,5 M, arginina-HCl 0,5 M, EDTA 10 mM, GSH 3 mM, GSSG 0,3 mM) mientras se agitaba a 4°C. El procedimiento de replegado se llevó a cabo a una concentración de proteína de aproximadamente 0,29 g/l.

- 35 La solución de replegado se mantuvo durante 2 días a 4°C sin alterar y, a continuación se dializó contra un volumen de 8 veces de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 que contenía EDTA 10 mM, NaCl 0,15 M, arginina-HCl 0,15 M, sobre un periodo de 8-10 horas con cambios frecuentes de la solución tampón.

- 40 A continuación, la solución de proteína se retiró de la diálisis y se concentró usando filtros de AMICON con el corte de membrana de 10 kDa a aproximadamente 10-20 ml y se dializó toda la noche contra un volumen de 100 veces de Tris 0,1 M pH 8,0 que contenía EDTA 10 mM, NaCl 0,15 M. Este material se centrifugó para eliminar particulados, después se pasó sobre una resina de afinidad de lisina (Lisina-SEFAROSA 4B; Amersham Biosciences Piscataway, NJ). El (TAL6003)-plasminógeno se eluyó de la resina usando solución salina tamponada con Tris, pH 8,0 que contenía ácido epsilon aminocaproico 0,2 M (εACA).

Habitualmente se pudieron aislar, 80 mg de cuerpos de inclusión de 1 litro de cultivo celular y 40 mg se pudieron eluir en la etapa de cromatografía lisina-SEFAROSA.

50 **Propiedades de (TAL6003)-plasminógeno**

El (TAL6003)-plasminógeno purificado apareció como una banda en la región de 35-40 kDa mediante el análisis SDS-PAGE de proteína reducida tratada con (ditiotreitól) y no reducida. Su masa molecular, determinada por espectrometría de masas MALDI, fue de aproximadamente 38.140 Da, que se acerca al valor esperado.

- 55 Para determinar la velocidad de activación de (TAL6003)-plasminógeno por estreptoquinasa, se mezcló 1 mg/ml de (TAL6003)-plasminógeno recombinante con estreptoquinasa en una relación 1:100 de (TAL6003)-plasminógeno respecto a estreptoquinasa y se incubó a temperatura ambiente a pH 7. En varios puntos de tiempo, las muestras se retiraron y se paró la reacción con tampón de SDS-Page y se analizaron sobre SDS-PAGE reducido seguido por densitometría para determinar la conversión de molécula de (TAL6003)-plasminógeno de una cadena en (TAL6003)-plasma de dos cadenas. La activación porcentual de (TAL6003)-plasminógeno por estreptoquinasa se muestra en la figura 6 como la

pérdida de (TAL6003)-plasminógeno de longitud completa en el tiempo tal como se determina por SDS-PAGE.

Para confirmar la funcionalidad de kringle 1, los presentes inventores determinaron la unión de (TAL6003)-plasminógeno a lisina-SAFAROSA 4B. Tal como se muestra en la figura 7, (TAL6003)-plasminógeno se unió a lisina-SEFAROSA y se pudo eluir de la columna por un gradiente ϵ -ACA 0-20 mM como un pico sencillo a aproximadamente 4 mM. La capacidad de (TAL6003)-plasminógeno replegado de unirse a lisina-SEFAROSA indica que el dominio kringle de la molécula se pliega apropiadamente y el sitio de unión a lisina se activa completamente.

Para confirmar además la funcionalidad de kringle 1, la unión de ϵ -ACA a (TAL6003)-plasminógeno se midió al monitorizar los cambios asociados en fluorescencia de proteína como se describen Matsuka y otros, Eur. J. Biochem., 190:93-97 (1990) y Douglas y otros, J. Biochemistry 41:3302-3310 (2002), todos incorporados en el presente documento como referencia. La unión de ϵ -ACA a kringle 1 de (TAL6003)-plasminógeno da como resultado en una disminución en fluorescencia, probablemente debido a la desactivación de los residuos de triptófano que son parte del sitio de unión a lisina.

Para monitorizar este procedimiento, se añadieron alícuotas de 4 μ l a 16 p.L de una solución concentrada de ϵ -ACA se añade a 2 ml de (TAL6003)-plasminógeno 5 μ M en regulador de pH de Tris 50 mM que contenía NaCl, 20 mM, pH 8,0, 25°C. La fluorescencia se monitorizó en una longitud de onda de excitación de 298 nm y una longitud de onda de emisión de 340 nm en un espectrofotómetro de fluorescencia FLUOROMAX (Jobin Yvon, Inc., Edison, NJ); después de cada adición de ϵ -ACA la solución se dejó equilibrar hasta que no se observaron cambios adicionales en la fluorescencia.

Los valores de fluorescencia resultantes se corrigieron para dilución y se representaron contra la concentración de ϵ -ACA en un intervalo de 0-50 μ M de ϵ -ACA. Los datos se ajustaron por regresión no lineal para obtener un K_d de aproximadamente 19 μ M.

Una propiedad de plasminógeno es su capacidad de unir fibrina. A efectos de determinar si (TAL6003)-plasminógeno retiene la capacidad de interactuar con fibrina, sus propiedades de unión a fibrina se analizaron en un ensayo de placa de microtitulación en la cual la unión de (TAL6003)-plasminógeno a fibrina se valoró por su activación consecutiva por tPA y dando como resultado la lisis de coágulo. Para este propósito, 100 μ l de fibrinógeno 5mg/ml se polimerizó con trombina en cada pocillo de una placa de microtitulación. Varias concentraciones de (TAL6003)-plasminógeno se añadieron en la parte superior de los coágulos de fibrina y se incubaron durante 1 hora a 37°C. La placa se lavó extensivamente con PBS mientras los coágulos de fibrina están aún intactos y se unen a los pocillos. Después del lavado, una solución de 0,1 mg/ml de tPA se añadió a cada pocillo y la placa se incubó 2 horas a 37°C. Como un resultado, algunos de los coágulos se disolvieron completamente y algunos se disolvieron parcialmente, mientras los pocillos con cantidades muy bajas de (TAL6003)-plasminógeno y pocillos de control se mantuvieron prácticamente intactos. El grado de fibrinólisis se monitorizó midiendo la absorbancia de 280 nm de residuos de los coágulos iniciales reconstituidos en NaOH 1 M. Los valores de absorbancia se representaron como una función de la concentración de (TAL6003)-plasminógeno.

Tal como se muestra en la figura 8, la unión de (TAL6003)-plasminógeno a fibrina se sigue por una curva de unión sigmoide, clásica. Usando este ensayo, se encuentra que (TAL6003)-plasminógeno se une a fibrina con afinidad comparable a la del plasminógeno de longitud completa y la C_{50} de esta interacción (\sim 0,3 μ M) es comparable a la K_d de unión a fibrina de plasminógeno de longitud completa.

Estos experimentos indican que (TAL6003)-plasminógeno puede unir fibrina. Además, como mínimo, la interacción de (TAL6003)-plasminógeno con lisina-Sefarosa, su capacidad de unir ϵ -ACA con K_d esperado, su capacidad de unir fibrina, y su capacidad de ser activado por un activador de plasminógeno indicaron que esta molécula se producía en el sistema *E. coli* en una forma completamente funcional.

Purificación y formulación de (TAL6003)-plasmina

La adición de SK a la solución de (TAL6003)-plasminógeno purificado efectúa la conversión de (TAL6003)-plasminógeno a (TAL6003)-plasmina. La proteína se concentró a 2 mg/ml y se diluyó 1:1 con glicerol al 50% para producir una solución de 1 mg/ml en glicerol al 25%. La solución se llevó a temperatura ambiente y se añadió estreptoquinasa en una relación molar de 1:100 de SK: (TAL6003)-plasminógeno. La reacción se incubó sin agitación a temperatura ambiente durante 4,5 horas. A continuación, la reacción se retardó mediante la adición de NaCl a una concentración final de 0,5M. El análisis de la activación por SDS-PAGE indica un rendimiento del 90% de la proteína activada.

(TAL6003)-plasmina activada se purificó por cromatografía de afinidad de benzamidina. El propósito de la purificación con afinidad de benzamidina era la separación de (TAL6003)-plasminógeno no activado e impurezas, que incluían

productos de degradación de (TAL6003)-plasmina, de (TAL6003)-plasmina activa. La solución de activación de SK se aplicó a una columna de flujo rápido benzamidina-SEFAROSA 4 equilibrada. La (TAL6003)-plasmina, sujeta e intacta, se capturó por la resina de afinidad mientras las impurezas mencionadas anteriormente fluían a través de la columna. La columna se lavó con un regulador de pH de equilibrio hasta que la absorbancia a 280 nm alcanzó la línea de base. A continuación, la (TAL6003)-plasmina unida se eluyó usando una etapa de ϵ -ACA de pH bajo para retirar toda la proteína restante de la columna. Rendimientos usuales fueron el 75%, con la proteína que es el 95% activa como se midió por el ensayo de potencia de plasmina cromogénica.

Dado que (TAL6003)-plasmina, similar a plasmina de longitud completa, es propensa a la autodegradación a pH fisiológico se escogió, pH 3,6 para la formulación final (acidificada con ácido acético-solución salina). Tal como muestran previamente para plasmina Novokhatny y otros, J Thromb Haemost., 1(5):1034-41 (2003), incorporado para referencia, y confirmado en experimentos con (TAL6003)-plasmina, esta formulación de pH bajo, con capacidad reguladora de pH baja no solamente permite el almacenamiento seguro de plasminas activas durante periodos de tiempo prolongados, sino que también es compatible con administración parenteral de estos trombolíticos directos. Cuando se mezcla con plasma o reguladores de pH neutros, (TAL6003)-plasmina se reactiva rápidamente.

Propiedades enzimáticas de (TAL6003)-plasmina

La actividad amidolítica de (TAL6003)-plasmina se examinó usando el sustrato de plasmina D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilida (S-2251) (DiaPharma, West Chester, OH).

Para (TAL6003)-plasmina, en pH 7,4, 25°C en regulador a pH de PBS, la constante Michaelis-Menten (K_M) para S-2251 se encontró también que era 141 μ M (tabla 2). La k_{cat} para la preparación se encontró que era aproximadamente 725 min^{-1} . Usando valoración de clorhidrato de 4-guanidinobenzoato de 4-nitrofenilo (pNPGb) (Chase, T y E. Shaw, Methods Enzymol. 197:20-27 (1970)), el porcentaje de sitios activos funcionales se encontró que era del 67%. Se determinó la corrección de k_{cat} para sitios activos porcentuales, un k_{cat} de aproximadamente 725 min^{-1} . Este valor es muy cercano al valor determinado en el mismo ensayo para plasmina de longitud completa, 820 \pm 23 min^{-1} y para microplasmina (que carece de los cinco kringles), 795 \pm 24 min^{-1} . Estos datos indican que la presencia o ausencia de kringles no afecta la actividad catalítica del dominio de serina proteasa.

	K_M	K_{cat}
Plasmina	220 \pm 9 μ M	820 \pm 23 min^{-1}
Miniplasmina	160 \pm 30 μ M	770 \pm 70 min^{-1}
Microplasmina	145 \pm 13 μ M	795 \pm 24 min^{-1}
(TAL6003)-plasmina	141 \pm 9 μ M	725 min^{-1}

La velocidad de inhibición de (TAL6003)-plasmina por α_2 -anti-plasmina se determinó que era $1,8 \pm 0,06 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ usando el método de Wiman y Colen (Wiman, B. y D. Collen, Eur. J. Biochem. 84:573-578(1978)) en el que la plasmina y la α_2 -anti-plasmina se mezclan, a continuación, se analizan para observar la actividad de S-2251 en puntos de tiempo específicos (tabla 3). Este valor es comparable a valores reportados para plasmina de $2,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (de Anonick, y otros, Thrombosis Res. 59:449 (1990)).

	α_2 -anti-plasmina
Plasmina	$2,5 \pm 0,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (I)
Miniplasmina	$2,4 \pm 0,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Microplasmina	$1,8 \pm 0,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
(TAL6003)-plasmina	$1,8 \pm 0,06 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Los mismos experimentos conducidos con microplasmina revelaron las velocidades de inhibición de α_2 -anti-plasmina de $1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $3,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en dos experimentos separados. La velocidad de inhibición de α_2 -anti-plasmina de miniplasmina (composición de dominio miniplasmina, K5-SP) se determinó que era $2,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Estos datos están de acuerdo con los valores de literatura para microplasmina y miniplasmina y muestran que la inhibición de (TAL6003)-plasmina por α_2 -anti-plasmina es 40 veces más rápida que la inhibición de microplasmina o miniplasmina. De esta manera, estos resultados indican que (TAL6003)-plasmina debería inhibirse rápidamente por α_2 -anti-plasmina debido a la presencia de kringles en su estructura. En general, los datos presentados en esta sección muestran que las

propiedades enzimáticas e inhibidoras de (TAL6003)-plasmina es similar a plasmina de longitud completa.

Los valores de literatura se toman de Anonick, y otros Thrombosis Res. 59:449(1990). Todas las velocidades se midieron de acuerdo a los métodos publicados en Anonick, y otros.

5

Eficacia fibrinolítica *in vitro*

La eficacia fibrinolítica de (TAL6003)-plasmina se analizó en un modelo *in vitro* de ensayo de lisis de coágulo usando el siguiente protocolo experimental.

10

Comparación *in vitro* de la eficacia trombolítica de (TAL6003)-plasmina con plasmina derivada de plasma. Cantidades equimolares de plasmina derivada de plasma (0,25 mg/ml) y (TAL6003)-plasmina (0,11 mg/ml) se mezclaron con coágulos de sangre en el tubo de ensayo y el grado de lisis de coágulo se monitorizó por absorbancia A₂₈₀ de material liberado del coágulo.

15

Las concentraciones de plasmina o (TAL6003)-plasmina requeridas para superar los inhibidores de plasma en presencia de fibrina e iniciar la lisis de coagulo se muestran en la figura 9.

LISTADO DE SECUENCIAS

20

<110> Solicitante: Talecris Biotherapeutics, Inc.
Novokhatny, Valery

25

<120> Plasmina modificada de forma recombinante

<130> T126 1190.PCT

30

<150> US 60/991,148
<151> 29-11-2007

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

35

<210> SEQ ID NO: 1
<211> 1032
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene un único dominio N-terminal kringle homólogo a un dominio kringle de un plasminógeno humano nativo

45

<400> 1
atgcgtgatg tcgtcttatt cgagaagaaa gtctatttat ctgaatgtaa aacaggcaat 60

ggtaaaaact atcgcggtac catgtccaaa acaaaaaacg gtatcacttg tcaaaaatgg 120

50

tctagcactt caccatcg tcctcgttc tcccctgcga cccatccctc tgaaggcctc 180

gaagaaaact actgccgcaa ccccgataat gatcctcaag gccatgggtg ttatactacc 240

55

gatcctgaaa aacgttatga ctattgcat gtcccacaat gcgcagcccc ttctttgat 300

tgcggcaaac cacaagtga acccaagaaa tgccaggtc gtgtgtcgg cggttgtgt 360

gcgcaccccc acagttggcc gtggcaggtc tcattacgta cccggtttgg aatgcacttt 420

60

tgtggcggca ctctcatctc gcccgatgg gttcttacag ctgcacactg tttgaaaaa 480

ES 2 534 040 T3

	agccccgc cttctcta taaagtatc ctcggcgcac atcaagaagt caatttagaa	540
	cctcatgtac aagaaatcga agtatctcgt ttattcctgg aaccgactcg caaagacatc	600
5	gcattactta aactgtcctc ccccgtgtg atcaccgata aagtaattcc cgcgtgtta	660
	cctctccta attatgtgtg tgcagatcgt acagaatgct ttattaccgg ctggggtgaa	720
10	actcaaggta ctttgggtgc gggactcctg aaagaagcac agttaccagt catcgaaaac	780
	aaagtatgta atcgctacga attctaaac ggcgtgttc aatccacaga attgtgcgca	840
	ggtcatttag cagggtggcac tgatagctgt caaggtgatt cagggtgtcc tctcgtatgt	900
15	ttcgaaaaag ataaatata tctgcaaggc gtcacctctt ggggttagg ttgtgctcgt	960
	ccaataaac ctggtgtata tgtacgtgta agtcgttttg ttacctggat tgaaggtgtt	1020
20	atgcggaaca ac	1032

<210> 2
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido que tiene un único dominio N-terminal kringle homólogo a un dominio kringle de un plasminógeno humano nativo

<400> 2

	Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys	
35	1 5 10 15	

	Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys	
40	20 25 30	

	Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg Pro	
45	35 40 45	

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

	Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr	
55	65 70 75 80	

	Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala	
60	85 90 95	

	Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro	
65	100 105 110	

ES 2 534 040 T3

Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp
 115 120 125
 5 Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr
 130 135 140
 10 Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys
 145 150 155 160
 15 Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu
 165 170 175
 20 Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe
 180 185 190
 25 Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn
 210 215 220
 30 Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu
 225 230 235 240
 35 Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro
 245 250 255
 40 Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg
 260 265 270
 45 Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp
 290 295 300
 50 Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg
 305 310 315 320
 55 Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp
 325 330 335
 60 Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 340
 <210> 3

ES 2 534 040 T3

<211> 2430
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5	<400> 3	
	atggaacata aggaagtgt tcttctactt cttttatttc tgaatcagg tcaaggagag	60
	cctctggatg actatgtgaa taccagggg gcttctactgt tcagtgtcac taagaagcag	120
10	ctgggagcag gaagtataga agaatgtgca gcaaatgtg aggaggacga agaattcacc	180
	tgcagggcat tccaatatca cagtaaagag caacaatgtg tgataatggc tgaaacagg	240
15	aagtcctcca taatcattag gatgagagat gtagttttat tgaaaagaa agtgtatctc	300
	tcagagtgca agactgggaa tggaaagaac tacagaggga cgatgtcca aacaaaaaat	360
	ggcatcacct gtcaaaaatg gagtccact tctcccaca gacctagatt ctcacctgct	420
20	acacaccctc cagagggact ggaggagaac tactgcagga atccagacaa cgatccgcag	480
	gggcctgtg gctatactac tgatccagaa aagagatag actactgcca cattcttgag	540
25	tgtgaagagg aatgtatgca ttgcagtga gaaaactatg acggcaaat ttccaagacc	600
	atgtctggac tggaaatcca ggcctgggac tctcagagcc cacacgtca tggatacatt	660
	ccttcaaat ttccaacaa gaacctgaag aagaattact gtcgtaacc cgatagggag	720
30	ctgcggcctt ggtgtttcac caccgacccc aacaagcgct gggaactttg cgacatcccc	780
	cgctgcacaa cacctccacc atcttctggt cccacctacc agtgtctgaa gggaacaggt	840
35	gaaaactatc gcgggaatgt ggctgttacc gttccgggc acacctgtca gcactggagt	900
	gcacagacct ctcacacaca taacaggaca ccagaaaact tcccctgcaa aaatttggat	960
	gaaaactact gccgcaatcc tgacggaaaa agggcccat ggtgccatac aaccaacagc	1020
40	caagtgcggt gggagtactg taagataccg tctgtgact cctccccagt atccacggaa	1080
	caattggctc ccacagcacc acctgagcta acccctgtgg tccaggactg ctacatggt	1140
45	gatggacaga gctaccgagg cacatcctcc accaccacca caggaaagaa gtgtcagtct	1200
	tggatcatca tgacaccaca ccggcaccag aagaccccag aaaactacct aaatgctggc	1260
	ctgacaatga actactgcag gaatccagat gccgataaag gccctgtgtg tttaccaca	1320
50	gacccagcgc tcaggtggga gtactgcaac ctgaaaaaat gctcaggaac agaagcgagt	1380
	gtttagcac ctccgctgtg tgcctgctt ccagatgtag agactcctc cgaagaagac	1440
55	tgtatgttg ggaatgggaa aggataccga ggcaagaggg cgaccactgt tactgggacg	1500
	ccatgccagg actgggctgc ccaggagccc catagacaca gcattttcac tccagagaca	1560
	aatccacggg cgggtctgga aaaaaattac tgccgtaacc ctgatggtga ttaggtggt	1620
60	ccctggtgct acacgacaaa tccaagaaaa ctttacgact actgtgatgt ccctcagtgt	1680

ES 2 534 040 T3

gcgggcccct catttgattg tgggaagcct caagtggagc cgaagaaatg tctggaagg 1740
 5 gttgtggggg ggtgtgtggc ccaccacat tctggccct ggcaagtcag tcttagaaca 1800
 aggtttgaa tgcactctg tggaggcacc ttgatatccc cagagtgggt gttgactgt 1860
 gccactgct tggagaagtc cccaaggcct tcatctaca aggtcatcct gggcgcacac 1920
 10 caagaagtga atctgaacc gcatgtcag gaaatagaag tgtctaggct gttctggag 1980
 cccacacgaa aagatattgc ctgctaaag ctaagcagtc ctgccgtcat cactgacaaa 2040
 gtaatcccag ctgtctgcc atcccaaat tatgtgtcg ctgaccggac cgaatgttc 2100
 15 atcactggct ggggagaaac ccaaggfact ttggagctg gccttctca ggaagcccag 2160
 ctccctgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtcaa 2220
 20 tccaccgaac tctgtctgg gcatctggcc ggaggcactg acagttgcca gggcgacagt 2280
 ggaggtcctc tggtttctt cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttctgg 2340
 25 ggtctggct gtgcacgcc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgttc aaggtttgt 2400
 actggattg agggagtgat gagaataat 2430

30 <210> 4
 <211> 810
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 4
 Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 40 Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser
 20 25 30
 45 Leu Phe Ser Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu
 35 40 45
 50 Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe
 50 55 60
 55 Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg
 65 70 75 80
 60 Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys
 85 90 95
 Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg
 100 105 110

ES 2 534 040 T3

5 Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser
115 120 125

10 Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser
130 135 140

15 Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln
145 150 155 160

20 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
165 170 175

25 Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
180 185 190

30 Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
195 200 205

35 Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
210 215 220

40 Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu
225 230 235 240

45 Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu
245 250 255

50 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
260 265 270

55 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
275 280 285

60 Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro
290 295 300

65 His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
305 310 315 320

70 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His
325 330 335

75 Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
340 345 350

ES 2 534 040 T3

Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro
 355 360 365
 5
 Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
 370 375 380
 10
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
 385 390 395 400
 15
 Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr
 405 410 415
 20
 Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp
 420 425 430
 25
 Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 435 440 445
 30
 Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro
 450 455 460
 35
 Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 465 470 475 480
 40
 Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
 485 490 495
 45
 Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 500 505 510
 50
 His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
 515 520 525
 55
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
 530 535 540
 60
 Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
 545 550 555 560
 Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys
 565 570 575
 Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp
 580 585 590

ES 2 534 040 T3

Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly
 595 600 605

5 Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu
 610 615 620

10 Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His
 625 630 635 640

15 Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg
 645 650 655

20 Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser
 660 665 670

25 Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser
 675 680 685

30 Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp
 690 695 700

35 Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln
 705 710 715 720

40 Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn
 725 730 735

45 Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly
 740 745 750

50 Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu
 755 760 765

55 Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys
 770 775 780

60 Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val
 785 790 795 800

Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 805 810

<210> 5
 <211> 791
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 534 040 T3

<400> 5

5 Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser Leu Phe Ser
 1 5 10 15

 Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu Cys Ala Ala
 20 25 30
 10 Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe Gln Tyr His
 35 40 45

 15 Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg Lys Ser Ser
 50 55 60

 20 Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys Lys Val Tyr
 65 70 75 80

 Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met
 85 90 95
 25

 Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser
 100 105 110
 30

 Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu
 115 120 125

 35 Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp
 130 135 140

 40 Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu
 145 150 155 160

 Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly
 165 170 175
 45

 Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser
 180 185 190
 50

 Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys
 195 200 205

 55 Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro
 210 215 220

 60 Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile
 225 230 235 240

ES 2 534 040 T3

Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys
 245 250 255
 5
 Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr Val
 260 265 270
 10
 Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His
 275 280 285
 15
 Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr
 290 295 300
 20
 Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr Asn
 305 310 315 320
 Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp Ser Ser
 325 330 335
 25
 Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu Leu Thr
 340 345 350
 30
 Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly
 355 360 365
 35
 Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser
 370 375 380
 40
 Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala
 385 390 395 400
 Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro
 405 410 415
 45
 Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu
 420 425 430
 50
 Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro Pro Pro Val
 435 440 445
 55
 Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp Cys Met Phe
 450 455 460
 60
 Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr Val Thr Gly
 465 470 475 480

ES 2 534 040 T3

Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His Ser Ile
 485 490 495
 5 Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn Tyr Cys
 500 505 510
 10 Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn
 515 520 525
 15 Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala Pro
 530 535 540
 Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly
 545 550 555 560
 20 Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln
 565 570 575
 25 Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu
 580 585 590
 30 Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser
 595 600 605
 35 Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val
 610 615 620
 40 Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu
 625 630 635 640
 45 Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala
 645 650 655
 50 Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr
 660 665 670
 55 Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr
 675 680 685
 60 Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val
 690 695 700
 Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val
 705 710 715 720

ES 2 534 040 T3

Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser
725 730 735

5 Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys
740 745 750

10 Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro
755 760 765

15 Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile
770 775 780

Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
785 790

20 <210> 6
<211> 723
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 6

30 Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys
1 5 10 15

Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys
20 25 30

35 Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg Pro
35 40 45

40 Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr
50 55 60

45 Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr
65 70 75 80

50 Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu
85 90 95

Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys
100 105 110

55 Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His
115 120 125

60 Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys
130 135 140

ES 2 534 040 T3

5 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr
 145 150 155 160

Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr
 165 170 175

10 Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr
 180 185 190

15 Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr Val Ser Gly His Thr
 195 200 205

20 Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His Asn Arg Thr Pro
 210 215 220

25 Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
 225 230 235 240

30 Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg
 245 250 255

Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr
 260 265 270

35 Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu Leu Thr Pro Val Val Gln
 275 280 285

40 Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr
 290 295 300

45 Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro His
 305 310 315 320

Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met
 325 330 335

50 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr
 340 345 350

55 Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser
 355 360 365

60 Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro Pro Pro Val Val Leu Leu Pro
 370 375 380

ES 2 534 040 T3

Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys
385 390 395 400

5
Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln
405 410 415

10
Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Glu
420 425 430

15
Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp
435 440 445

20
Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu
450 455 460

25
Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys
465 470 475 480

30
Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly
485 490 495

35
Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu
515 520 525

40
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser
530 535 540

45
Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro
545 550 555 560

50
His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg
565 570 575

55
Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp
580 585 590

60
Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp
595 600 605

60
Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe
610 615 620

ES 2 534 040 T3

5 Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
115 120 125

10 Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu
130 135 140

15 Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu
145 150 155 160

20 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
180 185 190

25 Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro
195 200 205

30 His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
210 215 220

35 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His
225 230 235 240

40 Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
245 250 255

45 Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro
260 265 270

50 Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
275 280 285

55 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
290 295 300

60 Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr
305 310 315 320

65 Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp
325 330 335

70 Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
340 345 350

ES 2 534 040 T3

5 Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro
355 360 365

10 Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp
370 375 380

15 Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
385 390 395 400

20 Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
405 410 415

25 His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
420 425 430

30 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
435 440 445

35 Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
450 455 460

40 Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys
465 470 475 480

45 Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp
485 490 495

50 Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly
500 505 510

55 Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu
515 520 525

60 Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His
530 535 540

65 Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg
545 550 555 560

70 Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser
565 570 575

75 Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser
580 585 590

ES 2 534 040 T3

Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp
595 600 605

5 Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln
610 615 620

10 Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn
625 630 635 640

15 Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly
645 650 655

20 Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu
660 665 670

Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys
675 680 685

25 Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val
690 695 700

30 Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
705 710

<210> 8
<211> 713
35 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

40 Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly
1 5 10 15

45 Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser
20 25 30

50 Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu
35 40 45

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

55 Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp
65 70 75 80

60 Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr
85 90 95

ES 2 534 040 T3

5 Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp
100 105 110

10 Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro
115 120 125

15 Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu
130 135 140

20 Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys
145 150 155 160

25 Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr
165 170 175

30 Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val
180 185 190

35 Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His
195 200 205

40 Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu
210 215 220

45 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr
225 230 235 240

50 Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp
245 250 255

55 Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu
260 265 270

60 Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr
275 280 285

65 Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp
290 295 300

70 Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro
305 310 315 320

75 Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys
325 330 335

ES 2 534 040 T3

Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys
 340 345 350
 5
 Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro Pro
 355 360 365
 10
 Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp Cys
 370 375 380
 15
 Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr Val
 385 390 395 400
 20
 Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His
 405 410 415
 25
 Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn
 420 425 430
 30
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
 435 440 445
 35
 Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala
 450 455 460
 40
 Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys
 465 470 475 480
 45
 Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro
 485 490 495
 50
 Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly
 500 505 510
 55
 Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu
 515 520 525
 60
 Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln
 530 535 540
 65
 Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu
 545 550 555 560
 70
 Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser
 565 570 575

ES 2 534 040 T3

Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro
580 585 590

5 Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly
595 600 605

10 Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu
610 615 620

15 Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly
625 630 635 640

Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr
645 650 655

20 Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys
660 665 670

25 Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala
675 680 685

30 Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr
690 695 700

35 Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
705 710

40 <210> 9
<211> 335
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Polipéptido que tiene un único dominio N-terminal kringle homólogo a un dominio kringle de un plasminógeno humano nativo

50 <400> 9
Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg
1 5 10 15

55 Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser
20 25 30

Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser
35 40 45

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

ES 2 534 040 T3

5 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
65 70 75 80

Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln
85 90 95

10 Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala
100 105 110

15 His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly
115 120 125

20 Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr
130 135 140

25 Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val
145 150 155 160

Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu
165 170 175

30 Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala
180 185 190

35 Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro
195 200 205

40 Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys
210 215 220

45 Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu
225 230 235 240

Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg
245 250 255

50 Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly
260 265 270

55 His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
275 280 285

60 Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser
290 295 300

ES 2 534 040 T3

Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg
 305 310 315 320

5

Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 325 330 335

10

<210> 10
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido que tiene un único dominio N-terminal kringle homólogo a un dominio kringle de un plasminógeno humano nativo

20

<400> 10

20

Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly
 1 5 10 15

25

Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser
 20 25 30

30

Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu
 35 40 45

35

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

40

Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp
 65 70 75 80

45

Val Pro Gln Cys Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val
 85 90 95

50

Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His
 100 105 110

55

Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met
 115 120 125

60

His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala
 130 135 140

65

Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile
 145 150 155 160

ES 2 534 040 T3

Leu Gly Ala His Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile
165 170 175

5 Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu
180 185 190

10 Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala
195 200 205

15 Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe
210 215 220

Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu
225 230 235 240

20 Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr
245 250 255

25 Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His
260 265 270

30 Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
275 280 285

35 Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp
290 295 300

Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val
305 310 315 320

40 Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
325 330

45 <210> 11
<211> 79
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50 <220>
<221> Kringle1
<222> (1)..(79)

55 <400> Secuencia: 11

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
1 5 10 15

60

ES 2 534 040 T3

Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
20 25 30

5 Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn
35 40 45

10 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
50 55 60

15 Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu Cys
65 70 75

20 <210> 12
<211> 78
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <220>
<221> Kringle2
<222> (1)..(78)

30 <400> 12

35 Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr
1 5 10 15

40 Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala
20 25 30

45 His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn
35 40 45

50 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50 55 60

55 Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys
65 70 75

60 <210> 13
<211> 78
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Kringle3
<222> (1)..(78)

<400> 13

ES 2 534 040 T3

Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr
1 5 10 15

5 Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr
20 25 30

10 His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn
35 40 45

15 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr
50 55 60

20 Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
65 70 75

25 <210> 14
<211> 78
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <220>
<221> Kringle4
<222> (1)..(78)

35 <400> 14

Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

40 Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg
20 25 30

45 His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn
35 40 45

50 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50 55 60

55 Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Lys Cys
65 70 75

60 <210> 15
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Kringle5
<222> (1)..(80)

ES 2 534 040 T3

<400> 15

5 Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
1 5 10 15

10 Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
20 25 30

15 His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
35 40 45

20 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
50 55 60

25 Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
65 70 75 80

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polinucleótido, caracterizado porque comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es por lo menos 95% idéntico a la SEQ ID NO: 2, que tiene
- a) un dominio kringle N-terminal único homólogo a un dominio kringle del plasminógeno humano nativo, en el que los cuatro últimos residuos de aminoácidos dentro del dominio kringle son V, P, Q y C; y
- b) un sitio de activación del dominio C-terminal y un dominio de serina proteasa homólogos a los dominios correspondientes en el plasminógeno humano; en los que el polipéptido se une a lisina inmovilizada.
- 10 2. Polinucleótido, según la reivindicación 1, en el que el polipéptido codificado es la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2.
- 15 3. Polinucleótido, según la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante degenerada de la misma.
4. Polinucleótido, según la reivindicación 1, en el que el polipéptido muestra una afinidad de unión más baja por el fibrinógeno que la afinidad de unión por el fibrinógeno de miniplasmina.
- 20 5. Polinucleótido, según la reivindicación 1, en el que el polipéptido muestra una afinidad de unión más alta por fibrina escindida parcialmente que la afinidad de unión por fibrina de miniplasmina escindida parcialmente.
- 25 6. Polinucleótido, según la reivindicación 1, en el que el polipéptido tiene inmunogenicidad reducida en comparación con un polipéptido de referencia, en el que el polipéptido de referencia tiene una secuencia de aminoácidos primaria idéntica a la secuencia de aminoácidos primaria del polipéptido con la condición de que los cuatro últimos residuos de aminoácidos del dominio kringle N-terminal único del polipéptido de referencia no sean V, P, Q, y C.
7. Polipéptido codificado por un polinucleótido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 30 8. Polipéptido, según la reivindicación 7, en el que el polipéptido muestra una actividad fibrinolítica que es inhibida por la α_2 -antiplasmina a una velocidad de inhibición que es por lo menos aproximadamente 5 veces más rápida que la velocidad de inhibición de la actividad fibrinolítica de miniplasmina por α_2 -antiplasmina.
- 35 9. Polipéptido, según la reivindicación 7, en el que el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, y sustituciones conservadoras de la misma.
- 40 10. Polipéptido, según la reivindicación 7, caracterizado además porque el polipéptido tiene un residuo de arginina en una posición relativa análoga a la de la posición 85 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.
- 45 11. Vector de expresión, que comprende el polinucleótido, según la reivindicación 1.
12. Célula cultivada, que comprende el vector de expresión, según la reivindicación 11.
13. Procedimiento para producir uno o más polipéptidos de plasmina recombinantes que tienen extremos N-terminales diferentes, comprendiendo el procedimiento:
- a) proporcionar un polipéptido, según la reivindicación 7; y
- b) poner en contacto el polipéptido proporcionado en la etapa a) con una proteasa en condiciones suficientes para escindir uno o más enlaces peptídicos para formar de esta manera uno o más polipéptidos de plasmina recombinantes que tienen extremos N-terminales diferentes.
- 50 14. Procedimiento, según la reivindicación 13, en el que el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2.
- 55 15. Procedimiento, según la reivindicación 13, en el que proporcionar comprende expresar una secuencia de ADN mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante degenerada de la misma, en *E. coli*.

FIG. 1

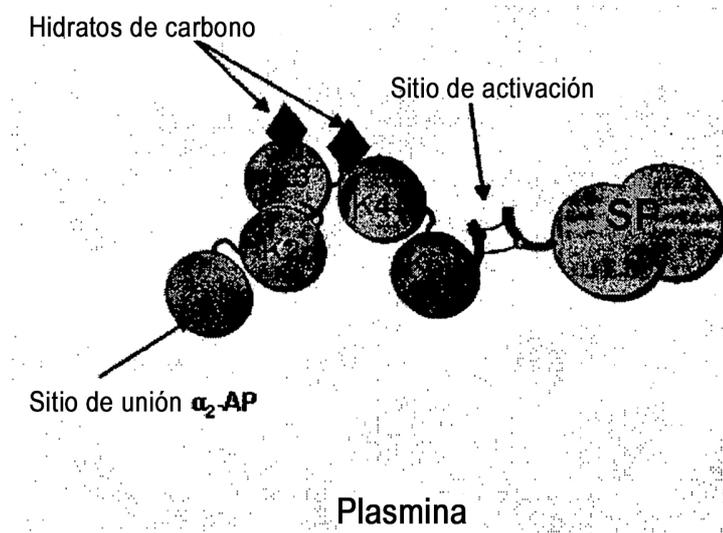


FIG. 2

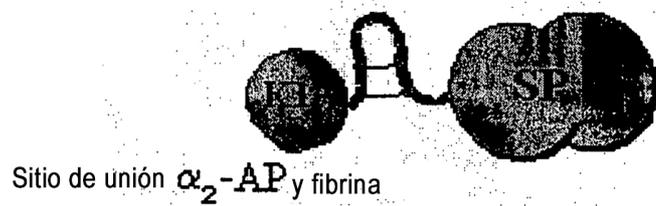


FIG. 3

-19 1
MEHKEVLLLLLFLKSGQGEPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEECAAKCEEDEEFTCRAFQ

78
YHSKEQQCVIMAENRKSSIIIR [REDACTED]

136 143 153 162
[REDACTED] ILECEECEMHCSGENYDG
kringle 1

234
KISKTMGLECQAWDSQSPHAGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPDRRLPWCFTTDPENKRWELCDIP
kringle 2

RCTTTPPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTCQHWSAQTPHTHNRTPENFPCKNLDENYCR
kringle 3

324
NPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSPVSTEQLAPTAPPELTPVVQDCYHGDGQSYRGTSS

426
TTTTGKKCQSWSSMTPHRHQKTPENYPNAGLTMNYCRNPADKGPWCFTTDPVSRWEYCNLKKCS
kringle 4

GTEASVWAPPPVLLPDVETPSEEDCMFGNGKGYRGRATTVTGTPCQDWAAQEPHRHSIFTPET
kringle 5

532 542 561
NPRAGLEKNYCRNPDGDVGGPWCYTTNPRKLYDYCD [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

791
[REDACTED] (SEQ ID NO:4)

FIG. 4

HK1	<u>CKTGNGKNYR</u>	<u>GTMSKTKNGI</u>	<u>TCQKWSSTSP</u>	<u>HR-PRFSPAT</u>	<u>HPSEGLEENY</u>
HK2	<u>CMHCSGENYD</u>	<u>GKISKTMGL</u>	<u>ECQAWDSQSP</u>	<u>HA-HGYIPSK</u>	<u>FPNKNLKKNY</u>
HK3	<u>CLKGTGENYR</u>	<u>GNVAVTVSGH</u>	<u>TCQHWSAQTP</u>	<u>HT-HNRTPEN</u>	<u>FPCKNLDENY</u>
HK4	<u>CYHGDGQSYR</u>	<u>GTSSTTTTGK</u>	<u>KCQSWSSMTP</u>	<u>HR-HQKTPEN</u>	<u>YPNAGLTMNY</u>
HK5	<u>CMFGNGKGYR</u>	<u>GKRATTVTGT</u>	<u>PCQDWAAQEP</u>	<u>HRHSIFTPET</u>	<u>NPRAGLEKNY</u>

(continuación)

HK1	<u>CRNPDNDPOG</u>	<u>PWCYTDDPEK</u>	<u>RYDYCDILEC</u>	(SEQ ID NO:11)
HK2	<u>CRNPDRE-LR</u>	<u>PWCFTTDPNK</u>	<u>RWELCDIPRC</u>	(SEQ ID NO:12)
HK3	<u>CRNPDGK-RA</u>	<u>PWCHTTNSQV</u>	<u>RWEYCKIPSC</u>	(SEQ ID NO:13)
HK4	<u>CRNPDAD-KG</u>	<u>PWCFTTDPSV</u>	<u>RWEYCNLKKC</u>	(SEQ ID NO:14)
HK5	<u>CRNPDGDVGG</u>	<u>PWCYTTNPRK</u>	<u>LYDYCDVPQC</u>	(SEQ ID NO:15)

FIG. 5

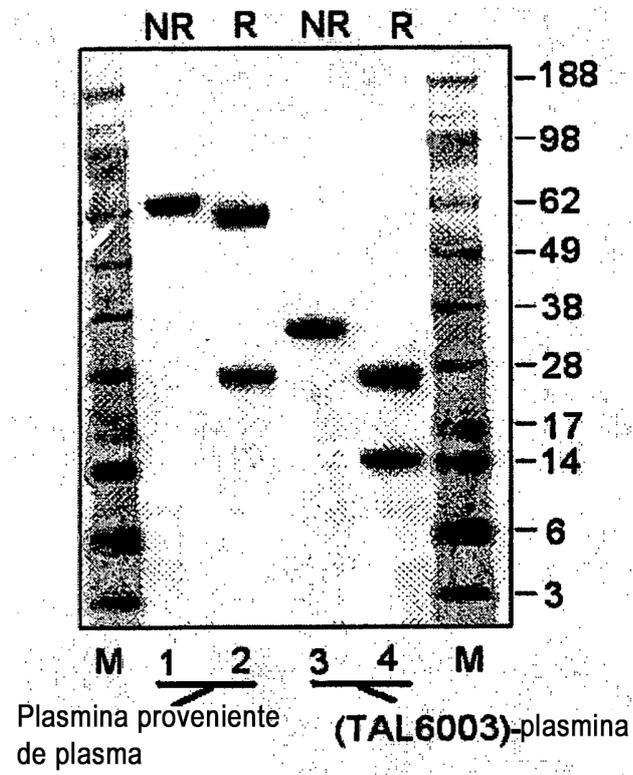


FIG. 6

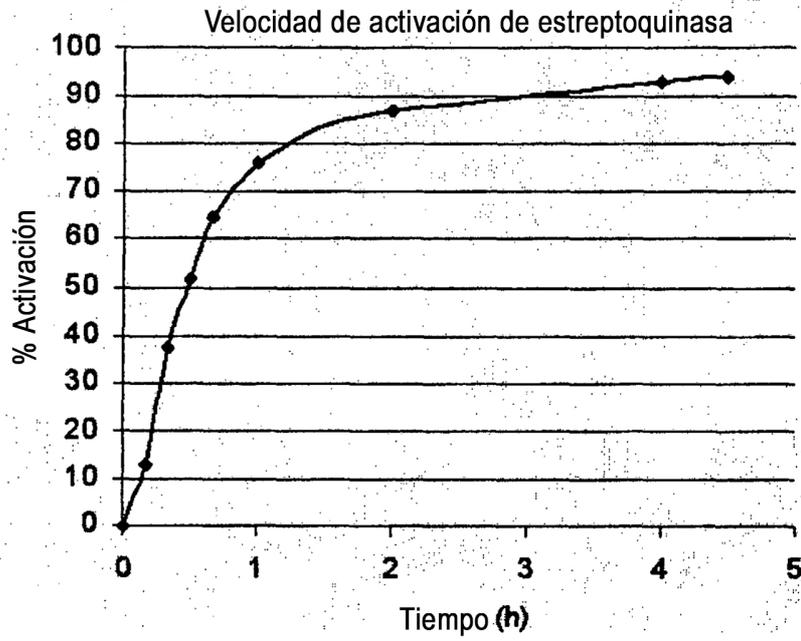


FIG. 7

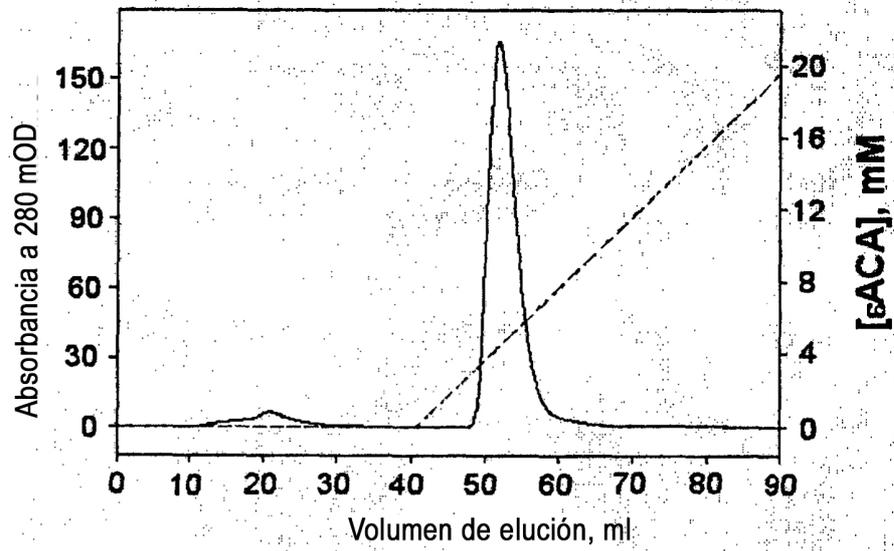


FIG. 8

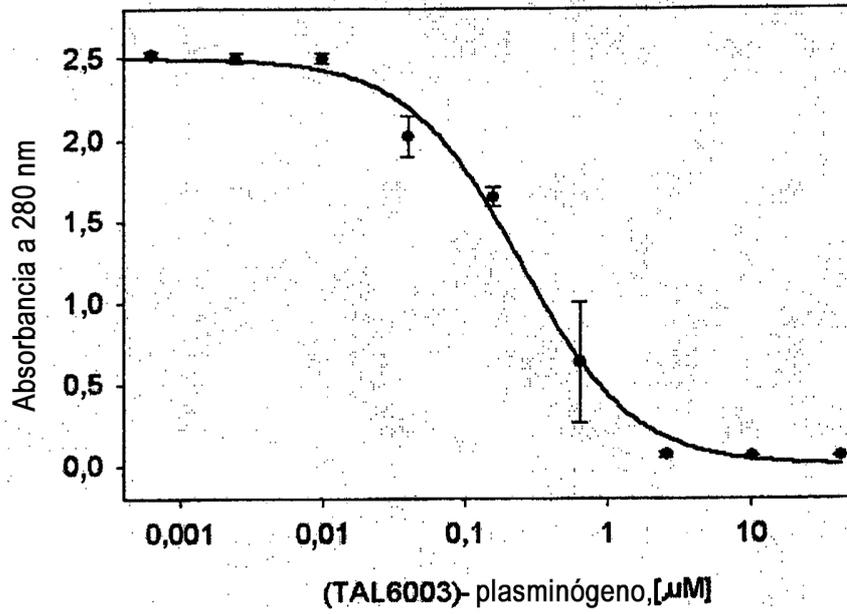


FIG. 9

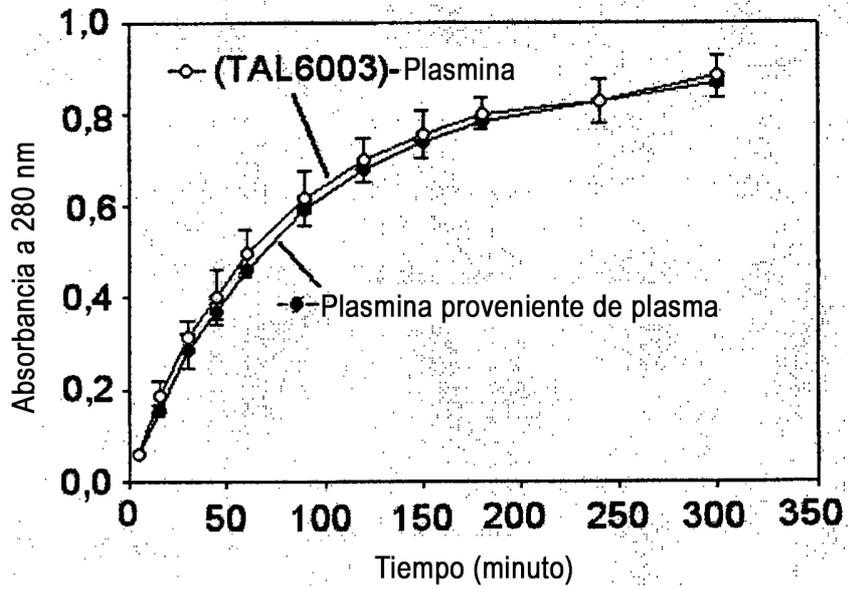
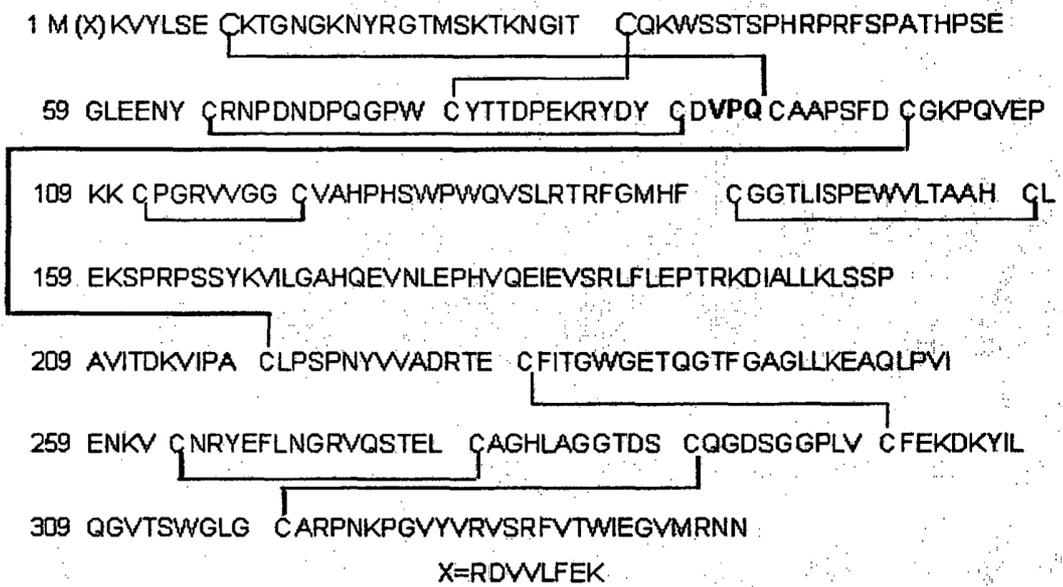


FIGURA 10



(SEQ ID NO:2)