

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 082**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C12N 9/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2012 E 12700154 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2661493**

54 Título: **Variantes de plasminógeno y plasmina**

30 Prioridad:

05.01.2011 EP 11150246

05.01.2011 US 201161429868 P

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

19.09.2016

73 Titular/es:

THROMBOGENICS N.V. (100.0%)

Gaston Geenslaan 1

3001 Heverlee, BE

72 Inventor/es:

ZWAAL, RICHARD REINIER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 583 082 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

Variantes de plasminógeno y plasmina

5 Campo de la invención

La invención se refiere a variantes de plasminógeno y plasmina que comprenden una o más mutaciones puntuales en el dominio catalítico que reduce o previene la destrucción autocatalítica de la actividad proteasa de la plasmina. Asimismo se divulgan composiciones, usos y métodos de utilización de dichas variantes de plasminógeno y plasmina.

10

Antecedentes de la invención

15

La activación de plasminógeno zimógeno da lugar a la formación de la serina proteinasa plasmina fibrinolítica/trombolíticamente activa. La activación de plasminógeno endógeno puede desencadenarse o potenciarse por la administración de un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa, estreptoquinasa, estafiloquinasa o APT, o cualquier variante del mismo. Tras la activación, la proteína de plasminógeno se escinde proteolíticamente en una cadena pesada que comprende los 5 dominios Kringle y una cadena ligera que comprende el dominio catalítico. Ambas cadenas se mantienen unidas a través de 2 enlaces disulfuro. Tras la activación, una escisión autolítica elimina un segmento N-terminal de la cadena pesada (78 aminoácidos de plasmina humana; 77 aminoácidos de plasmina bovina) y la cadena pesada de la plasmina bovina puede escindirse además autocatalíticamente entre los kringles 3 y 4, generando por tanto midiplasmina bovina (Christensen *et al.* 1995, *Biochem J* 305, 97-102). La activación de plasminógeno a plasmina, desencadenada por la escisión del enlace peptídico R561-V562 en plasminógeno humano, induce un gran cambio conformacional en la cadena ligera, dicho cambio da lugar al cebado, o activación, de la tríada catalítica en dicha cadena ligera. Los activadores de plasminógeno bacteriano, tales como estreptoquinasa y estafiloquinasa forman un complejo con plasminógeno y, sin escisión del enlace peptídico R561-V562 del plasminógeno, el sitio catalítico del plasminógeno se activa debido a los cambios conformacionales tras la formación del complejo activador-plasminógeno (se resumen los mecanismos de activación de plasminógeno, p. ej., en la sección Introducción de Terzyan *et al.* 2004; *Proteins* 56: 277-284).

20

25

30

Considerando que los activadores de plasminógeno actúan como agentes trombolíticos indirectos, se ha sugerido alternativamente el uso de la propia plasmina como agente fibrinolítico/trombolítico directo. Dicho uso directo, no obstante, se ve obstaculizado por el hecho de que la plasmina, al igual que muchas proteasas, se somete a la degradación proteolítica autocatalítica que sigue una cinética de segundo orden sometida a la inhibición del producto (Jespersen *et al.* 1986, *Thrombosis Research* 4, 395-404).

35

40

A comienzos de la década de 1960, se estableció que la plasmina puede estabilizarse en pH ácido, o alternativamente en pH neutro, se proporcionó un aminoácido, tal como una lisina presente Sin embargo, la escisión autolítica tras Lys 104, Arg189 y Lys622 (numeración en relación a Lys-plasmina) se describió incluso cuando la plasmina se almacena en un pH 3,8 (documento WO 01/36608). Cuando la plasmina se almacena en el pH incluso inferior a 2,2, la escisión del ácido no autolítico se produce entre Asp-Pro (D-P) en las posiciones Asp62, Asp154 y Asp346 (documento WO 01/36608). Esto ilustra que el pH puede reducirse en un punto en el que ya no existe degradación autocatalítica aparente aunque en el cual la hidrólisis ácida se está convirtiendo en un factor de desestabilización. No existe información alguna en el documento WO 01/36608 con respecto a qué enlaces peptídicos en plasmina son vulnerables a la hidrólisis (autocatalítica) en pH neutro. Los estabilizadores conocidos de plasmina incluyen glicerol, fibrinógeno de fuerza iónica suficientemente alta, y ácido ϵ -aminocaproico (EACA), divulgados por Jespersen *et al.* (1986, *Thromb Res* 41, 395-404). La lisina, los derivados de lisina (tales como EACA y ácido tranexámico) y ácido p-aminometilbenzoico (PAMBA) son algunos estabilizadores más conocidos (Uehsima *et al.* 1996, *Clin Chim Acta* 245, 7-18; Verstraete 1985, *Drugs* 29, 236-261). El documento US 4.462.980 describió la formación de agregados de plasmina que contribuyen a la degradación de plasmina a pesar del almacenamiento en condiciones ácidas. Una solución a este problema se proporcionó en el documento US 4.462.980 por medio de la adición de un compuesto polihidroxi. Otras formas de estabilizar plasmina incluyen la adición de compuestos oligopeptídicos (p. ej., documento US 5.879.923). Alternativamente, el sitio catalítico de plasmina puede bloquearse de manera reversible por medio de la derivatización, p. ej., acilación (documento EP 0009879). La pegilación de la plasmina también se ha sugerido como medio para estabilizar la enzima (documento WO 93/15189).

45

50

55

60

Se han descrito una serie de variantes de plasmina distintas a las formas truncadas de plasmina e incluyen una microplasmina quimérica (documento WO 2004/045558) y variantes con una mutación puntual en el sitio de escisión de dos cadenas (documento US 5.087.572) o en un aminoácido de tríada catalítica (Mhashilkar *et al.* 1993, *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 90, 5374-5377; Wang *et al.*, 2001, *J Mol Biol* 295, 903-914). Wang *et al.* (1995, *Protein Science* 4, 1758-67 y 1768-79) describieron una extensa serie de mutantes de microplasminógeno en las posiciones de los aminoácidos 545, 548, 550, 555, 556, 558, 560-564, 585, 740 y 788. Un doble mutante en el que se sustituyen las cisteínas en las posiciones de los aminoácidos 558 y 566 con serinas se describió por Linde *et al.* (1998, *Eur J Biochem* 251, 472-479). Takeda-Shitaka *et al.* (1999, *Chem Pharm Bull* 47, 322-328) se refieren a una variante de plasmina con actividad reducida, la variación implica la sustitución de alanina en la posición aminoácida 601 con treonina. Todas las posiciones aminoácidas mencionadas previamente son relativas a Glu-plasminógeno

65

comenzando con Glu en la posición aminoácida 1. Una variante de plasminógeno no escindible (escisión entre la cadena pesada y ligera alterada) se describe en el documento WO 91/08297. Dawson *et al.* (1994, *Biochemistry* 33, 12042-12047) describen la afinidad reducida para la estreptoquinasa de una variante de Glu-plasminógeno con Glu en lugar de Arg en la posición 719 (R719E). Jespers *et al.* (1998, *Biochemistry* 37, 6380-6386) produjeron en una exploración por Ala la serie de mutantes de sitio único de microplasminógeno expresado en fago H569A, R610A, K615A, D660A, Y672A, R712A, R719A, T782A, R789A, y se halló que la arginina en la posición 719 es clave para la interacción con la estafiloquinasa; el mutante D660A no se caracterizó adicionalmente debido a la expresión muy baja; solo se produjo adicionalmente el mutante R719A en forma soluble. Ninguno de los mutantes mostró una variación bruta de la actividad proteolítica (sustrato S-2403). Jespers *et al.* (1998) también incluyeron un mutante de sitio activo S741A en su análisis; la estructura cristalina de este mutante se divulga en Wang *et al.* (2000, *J Mol Biol* 295, 903-914). En otro intento de resolver los sitios de interacción de estreptoquinasa/plasminógeno, Terzyan *et al.* (2004, *Proteins* 56, 277-284) describieron una serie de mutantes de microplasminógeno (K698M, D740N, S741A) en un antecedente ya mutado (R561A), este último prohíbe la activación proteolítica de plasminógeno y por consiguiente prohíbe la formación de microplasmina activa (lo que complicaría el estudio del mecanismo de activación por contacto del complejo estreptoquinasa-microplasminógeno). Terzyan *et al.* (2004) mencionan además un mutante triple "involuntario" R561A/H569Y/K698M aparentemente indiferente funcionalmente del mutante doble R561A/K698M. Wang *et al.* (2000, *Eur J Biochem* 267, 3994-4001), en el estudio de la interacción de estreptoquinasa/plasmina(plasminógeno), se produjo un conjunto de mutantes de microplasminógeno (aminoácidos 530-791 de Glu-plasminógeno) en un antecedente Cys536Ala y Cys541Ser. Estos mutantes incluyen la mutación R561A como se ha descrito previamente (Terzyan *et al.* (2004)), así como mutantes dobles R561A/K698G, R561A/K698A y R561A/K698Q. En el mismo antecedente C536A/C541S, se introdujeron asimismo las únicas mutaciones de K698G y K698A, de las que K698G no se caracterizó aún más debido a las dificultades con la purificación. Los estudios previos se dirigieron a la obtención de una mejor comprensión de las características de la molécula de plasminógeno/plasmina y no se describió ninguna utilidad o beneficio clínico o presuntas ventajas clínicas de los mutantes de plasminógeno/plasmina. Peisach *et al.* (1999, *Biochemistry* 38, 11180-11188) tuvieron éxito en la determinación de la estructura cristalina de microplasminógeno que contiene las mutaciones M585Q, V673M y M788L.

Nguyen y Chrambach (1981, *Preparative Biochem* 11, 159-172) describieron la presencia de "un componente proteico menor y no identificado" de 10,0 kDa basado en la reducción por SDS-PAGE de una preparación comercial cruda de plasmina activada por uroquinasa (homolisina). Las diferencias en la autólisis de la plasmina humana en función del pH se han descrito con detalle por Shi y Wu (1988, *Thrombosis Research* 51, 355-364). Ohyama *et al.* (2004, *Eur J Biochem* 271, 809-820) propusieron el uso de moduladores de plasminógeno por el análogo no lisina en el tratamiento del cáncer debido a la mejora de la autoproteólisis de la plasmina por dichos compuestos que producen la formación mejorada de angiostatinas (en presencia del activador de plasminógeno uroquinasa). La Tabla 3 de Ohyama *et al.* (2004) enumera hasta 15 sitios de escisión en la plasmina sometida a compuestos que mejoran la autoproteólisis. Al discutir sus observaciones a la vista de las investigaciones previas, parece que los compuestos que mejoran la autoproteólisis mejoran selectivamente más o menos la proteólisis de la cadena B/ligera, mientras que la degradación mínima de ambas cadenas A/pesada y B se halló en ausencia de los compuestos que mejoran la autoproteólisis.

El documento WO 2011/004011 divulga variantes de plasmina(plasminógeno) autoproteolíticamente estable que comprenden la mutación de uno o más de los aminoácidos del dominio catalítico K698, K708 o R719.

Resulta evidente que ninguno de los métodos/variantes previos resuelve el problema de proporcionar una plasmina estabilizada en el nivel molecular. La provisión de una variante de plasmina (o de una variante de plasminógeno correspondiente a partir de la cual puede derivarse la plasmina) con un dominio catalítico intrínsecamente resistente a la degradación autocatalítica sería un importante paso adelante hacia un almacenamiento eficiente y seguro a largo plazo, así como un uso terapéutico eficiente y seguro de la plasmina, tal como en la terapia trombolítica o en la inducción del desprendimiento del vítreo posterior o licuefacción vítrea en el ojo.

Sumario de la invención

La invención se refiere a variantes de plasminógeno o plasminas aisladas obtenidas a partir de estas, o a variantes de plasmina aisladas, o a derivados proteolíticamente activos o inactivos reversibles de cualquiera de dichas plasminas caracterizadas por que:

comprenden en su dominio catalítico una mutación del aminoácido glutamato en la posición 138 del dominio catalítico de plasmina humana, o del resto de aminoácido correspondiente de un dominio catalítico de plasmina no humana, en el que dicho dominio catalítico de plasmina humana comienza por el aminoácido valina en la posición 1, que es el mismo que el aminoácido valina que aparece en la posición 562 del Glu-plasminógeno humano.

Cualquiera de las variantes de plasminógeno, variantes de plasmina, o derivados de plasmina previos puede comprender además la mutación de uno o más de los aminoácidos de lisina o arginina del dominio catalítico en un aminoácido no lisina, no arginina.

En cualquiera de los plasminógenos, plasminas, o derivados de plasmina previos, dichos aminoácidos lisina o arginina pueden seleccionarse en particular entre:

- 5 (i) lisina en la posición 137 del dominio catalítico de plasmina humana, o lisina o arginina correspondiente de un dominio catalítico de plasmina no humana;
- (ii) lisina en la posición 147 del dominio catalítico de plasmina humana, o lisina o arginina correspondiente de un dominio catalítico de plasmina no humana; o
- 10 (iii) arginina en la posición 158 del dominio catalítico de plasmina humana, o arginina o lisina correspondiente de un dominio catalítico de plasmina no humana;

en el que dicho dominio catalítico de plasmina humana comienza por el aminoácido valina en la posición 1, que es el mismo aminoácido valina que aparece en la posición 562 de Glu-plasminógeno humano.

15 En particular, cualquiera de las variantes de plasminógeno, variantes de plasmina, o derivados de plasmina previos comprende la mutación de dicho aminoácido glutamato en la posición 138 del dominio catalítico de plasmina humana, o del resto de aminoácido correspondiente del dominio catalítico de plasmina no humana a glutamato. En el presente documento, dicho dominio catalítico de plasmina humana puede ser el dominio catalítico comprendido en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 23, 25 o 27.

20 Cualquiera de las variantes de plasminógeno, variantes de plasmina, o derivados de plasmina según la invención pueden caracterizarse además por que su constante de autólisis es como máximo 95 % de la constante de autólisis de plasmina de tipo natural. Esta característica también puede servir como una definición de la reducción de la degradación autoproteolítica de una variante de plasminógeno o variante de plasmina como se ha descrito previamente en comparación con la degradación autoproteolítica del plasminógeno o plasmina de tipo natural correspondiente.

25 Cualquiera de las variantes de plasminógeno, variantes de plasmina, o derivados de plasmina según la invención pueden caracterizarse además por que la constante catalítica k_{cat} se encuentra en el intervalo de 10 % a 200 % de la k_{cat} de la plasmina de tipo natural.

30 Cualquiera de las variantes de plasminógeno, variantes de plasmina, o derivados de plasmina según la invención pueden caracterizarse además por que su constante de autólisis es como máximo 95 % de la constante de autólisis de plasmina de tipo natural y su constante catalítica k_{cat} se encuentra en el intervalo de 10 % a 200 % de la k_{cat} de la plasmina de tipo natural.

35 Sin imponer limitación alguna, cualquiera de las variantes previas de plasminógeno, variantes de plasmina, o derivados de plasmina según la invención pueden ser uno de Glu-plasminógeno o Glu-plasmina, Lys-plasminógeno o Lys-plasmina, midiplasminógeno o midiplasmina, miniplasminógeno o miniplasmina, microplasminógeno o microplasmina, deltaplasminógeno o deltaplasmina.

40 La invención se refiere además a las variantes de plasminógeno, variantes de plasmina, o derivados de plasmina aislados como se ha descrito previamente, o una combinación de cualquiera de los mismos para su uso como medicamento.

45 La invención también se refiere a composiciones que comprenden una variante de plasminógeno, variante de plasmina, o derivado de plasmina aislados como se ha descrito previamente, o una combinación de cualquiera de los mismos, y al menos uno de un diluyente, transportador o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Dicha composición puede comprender además opcionalmente al menos uno de un anticoagulante, un agente trombolítico, un agente antiinflamatorio, un agente antiviral, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, un antihistamínico o un anestésico.

50 La invención también incluye cualquier aplicación beneficiosa de una variante de plasminógeno, variante de plasmina, o derivado de plasmina aislados como se ha descrito previamente. Sin imponer limitación alguna, esta incluye: su uso en la inducción o favorecimiento de la lisis de un depósito patológico de fibrina en un sujeto, su uso en la inducción del desprendimiento vítreo posterior en el ojo y/o su uso en la inducción de la licuefacción del vítreo en el ojo, su uso en la resolución de la adhesión vitreomacular, su uso en el cierre de orificios maculares, su uso junto trabeculectomía, su uso en facilitar la vitrectomía quirúrgica en el ojo de un sujeto, su uso en el desbridamiento enzimático de un tejido lesionado de un sujeto, su uso en la reducción de fibrinógeno circulante en un sujeto, para su uso en la reducción de los niveles de alfa2-antiplasmina de un sujeto, su uso en la reducción del riesgo de depósito patológico de fibrina.

La invención se refiere además a

55 un método para la exploración de variantes de plasmina autoproteolíticamente estable, dicho método comprende las etapas de:

(i) la mutación de un aminoácido glutamato en las posiciones 138 del dominio catalítico de plasmina humana, o del resto de aminoácido correspondiente de una plasmina no humana, en un aminoácido diferente del aminoácido natural,

5 (ii) la determinación de la estabilidad autoproteolítica del mutante obtenido a partir de (i), como se determina con un ensayo de la actividad del sustrato cromogénico o biológico;

(iii) la selección a partir de (ii) de un mutante que es autoproteolíticamente estable como la variante de plasmina autoproteolíticamente estable;

10 en el que dominio catalítico de plasmina humana comienza por el aminoácido valina en la posición 1, que es el mismo aminoácido valina que aparece en la posición 562 de Glu-plasminógeno humano.

Cualquiera de los métodos de exploración anteriores puede comprender opcionalmente además una etapa en la que se determina la actividad proteolítica de la variante de plasmina autoproteolíticamente estable.

15 La invención incluye además métodos para mejorar la estabilidad de almacenamiento a largo plazo de una composición que comprende plasmina, comprendiendo dichos métodos la etapa de identificar una variante de plasmina autoproteolíticamente estable capaz de almacenarse durante un largo periodo sin pérdida significativa de la actividad proteolítica.

20 La invención incluye además métodos para producir una variante de plasminógeno según la invención, dichos métodos incluyen las etapas de:

(i) introducir un ácido nucleico codificante de un plasminógeno según la invención en una célula hospedadora adecuada capaz de expresar dicho plasminógeno;

25 (ii) cultivar la célula hospedadora obtenida en (i) en condiciones y durante un tiempo suficiente para la expresión de dicho plasminógeno en dicha célula hospedadora; y

(iii) recoger el plasminógeno expresado en (ii).

30 Dichos métodos pueden incluir opcionalmente además una etapa (iv) en la que se purifica el plasminógeno recogido en (iii).

La invención incluye asimismo métodos para producir una variante de plasmina según la invención, dichos métodos incluyen las etapas de:

35 (i) introducir un ácido nucleico codificante de un plasminógeno según la invención en una célula hospedadora adecuada capaz de expresar dicho plasminógeno;

(ii) cultivar la célula hospedadora obtenida en (i) en condiciones y durante un tiempo suficiente para la expresión de dicho plasminógeno en dicha célula hospedadora;

(iii) recoger el plasminógeno expresado en (ii);

40 (iv) activar el plasminógeno de (iii) en plasmina.

Dichos métodos pueden comprender además opcionalmente una etapa en la que el plasminógeno recogido en (iii) se purifica antes de la activación en (iv). Además, en cualquier método para producir una variante de plasmina según la invención, la plasmina activa obtenida en (iv) puede purificarse opcionalmente. Sin embargo, la variante de plasmina activa producida según un método de la invención puede opcionalmente derivatizarse y/o inactivarse de manera reversible.

45 Cualquiera de las variantes de plasminógeno, variantes de plasmina, o derivados de plasmina según la invención se obtienen preferentemente en forma libre, o soluble, p. ej., sin unirse a la superficie de un hospedador (tal como en la expresión en fagos).

50 La invención se refiere además a secuencias de ácido nucleico aisladas codificantes de una variante de plasminógeno o variante de plasmina según la invención. Los vectores recombinantes que comprenden dichos ácidos nucleicos forman también parte de la invención, así como las células hospedadoras transformadas con dicho ácido nucleico o vector recombinante.

Leyendas de las figuras

60 FIGURA 1. Secuencia de aminoácidos con doble numeración de las posiciones aminoácidas de Glu-plasminógeno humano de tipo natural (1 a 791) y del dominio catalítico de plasmina (1 a 230, secuencia aminoácida y numeración en negrita). El microplasminógeno empleado para demostrar la invención comienza en la posición aminoácida 543 (numeración con relación a Glu-plasminógeno). Los dominios Kringle (obtenidos a partir de la información incluida en el número de acceso GenBank AAA36451) se encuentran en recuadros y sus secuencias aminoácidas tipeadas alternan letras normales y cursivas. Los aminoácidos de tríada catalítica se rodean.

65

FIGURA 2. Alineación de la secuencia aminoácida de las proteínas de plasminógeno de mamífero recuperadas de GenBank. La alineación de secuencias se ejecutó con el software COBALT (herramienta de alineación múltiple basada en restricciones; Papadopoulos y Agarwala, *Bioinformatics* 23:1073-1079, 2007) disponible a través del sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (CNIB) con la configuración predeterminada. ▼: indicación del inicio de Glu-plasminógeno. La numeración de los aminoácidos es relativa al plasminógeno humano.

FIGURA 3. Reducción por análisis SDS-PAGE de la variante de microplasmina E138Q a modo de ejemplo. Línea izquierda: escalera de peso molecular, con indicación de los pesos moleculares. Línea 1: microplasminógeno E138Q antes de la activación. Línea 2: microplasmina E138Q, mismo material que en la línea 1 pero después de la activación. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie.

Descripción detallada de la invención

La actual invención se basa en los resultados del estudio de los mecanismos subyacentes a la autoinactivación no forzada de la actividad proteolítica de la plasmina en pH neutro, un estudio para el cual el inventor decidió centrarse en la microplasmina que consiste principalmente del dominio catalítico de plasmina. Los enlaces peptídicos susceptibles a la escisión por plasmina se encuentran en el C-terminal de lisina o arginina (Weinstein y Doolittle, 1972, *Biochim Biophys Acta* 258, 577-590). Casi el 10 % (22 de 230) de los aminoácidos del dominio catalítico de plasmina (comienza en el aminoácido 562, una valina en Glu-plasminógeno humano) son lisinas o argininas. Teóricamente todos los enlaces peptídicos C-terminal de estas lisinas y argininas, independiente de la estructura del aminoácido C-terminal de dicha lisina o arginina, en una molécula de plasmina pueden escindirse proteolíticamente por otra molécula de plasmina. Además, teóricamente, la mutación de uno cualquiera o más de estas lisinas o argininas en un aminoácido no arginina, no lisina haría una molécula de plasmina más resistente a la degradación autoproteolítica. Esta teoría ha demostrado ser correcta, como se describe en la solicitud de patente internacional n.º PCT/EP2010/059902 (WO 2011/004011). La base para la invención actual es la observación inesperada de la mutación de un aminoácido de tipo natural adyacente a una lisina o arginina en el dominio catalítico de plasmina en un aminoácido de tipo no natural, y esto sin mutar necesariamente dicha lisina o arginina, también aumenta en gran medida la resistencia de la plasmina mutante resultante de la degradación autoproteolítica.

Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere a moléculas de plasmina y a moléculas de plasminógeno, en particular moléculas de plasminógeno que son activables/pueden activarse potencialmente en plasmina, que comprenden en su dominio catalítico una o más mutaciones de aminoácidos, tales como enlaces peptídicos vulnerables a la degradación autoproteolítica en plasmina o plasminógeno de tipo natural que es menos o no vulnerable a la degradación autoproteolítica en la moléculas de plasmina y plasminógeno sujetas de la invención.

La invención, en otras palabras, se refiere a variantes de plasminógeno o plasminas aisladas obtenidas a partir de estas, o variantes de plasmina aisladas, o a derivados proteolíticamente activos o inactivos reversibles de cualquiera de dichas plasminas caracterizadas por que:

(i) comprenden en su dominio catalítico una mutación del aminoácido glutamato en la posición 138 del dominio catalítico de plasmina humana, o del resto de aminoácido correspondiente de un dominio catalítico de plasmina no humana, en el que dicho dominio catalítico de plasmina humana comienza por el aminoácido valina en la posición 1, que es igual que el aminoácido valina que aparece en la posición 562 de Glu-plasminógeno humano; y

(ii) la (presencia de) mutación de (i) reduce el grado de (o sensibilidad a, o susceptibilidad a, o vulnerabilidad a) la degradación autoproteolítica de dicha variante de plasmina en comparación con el alcance de la degradación autoproteolítica de plasmina de tipo natural, como puede determinarse p. ej., con un ensayo de actividad de sustrato cromogénico o biológico (véase más adelante).

Por consiguiente, el fin de la invención es proporcionar variantes de plasmina aisladas (tales como las obtenidas a partir de variantes de plasminógeno), o derivados proteolíticamente activos o inactivos reversibles de cualquiera de dichas plasminas, caracterizadas por que dichas variantes de plasmina o derivados de las mismas poseen una resistencia mayor/son más resistentes a la autoproteólisis en comparación con la plasmina de tipo natural. Algunos aspectos relativos a la determinación de la resistencia autoproteolítica/susceptibilidad se deducen a continuación.

Una mutación de un aminoácido en una posición dada en un "aminoácido de tipo no natural", o en un "aminoácido diferente del aminoácido natural", se considera que es un cambio de aminoácido en dicha posición dada de un plasminógeno o plasmina de tipo natural en cualquier aminoácido diferente de tipo natural o aminoácido natural en dicha posición dada de dicho plasminógeno o plasmina de tipo natural. Algunos aspectos relativos a la selección de las mutaciones se deducen a continuación.

Alternativamente, la variante de plasminógeno, la variante de plasmina, o derivado de plasmina según la invención puede comprender en consecuencia en su dominio catalítico la mutación de cualquier lisina o arginina en cualquier posición en un aminoácido no lisina, no arginina.

Un experto en la materia será capaz de decidir fácilmente en qué otro aminoácido puede mutarse un aminoácido de tipo natural. Tal decisión puede, aunque no debe necesariamente implicar, criterios tales como el tamaño de

aminoácidos, carga de aminoácidos, polaridad de aminoácidos, y/o índice de hidropatía de aminoácidos (véase la Tabla 1). Además, la disponibilidad de la estructura cristalina de plasminógeno y microplasmina (MMDB ID: 12717; PDB ID: 1DDJ; Wang *et al.*, 2001, *J Mol Biol* 295, 903-914) es de gran valor en la ayuda a la identificación de los aminoácidos mutantes, de modo tal que la molécula de plasmina o plasminógeno mutante resultante retiene la actividad proteolítica. Además, es de esperar que la mutación de un aminoácido de tipo natural en una posición dada [P+/-n], y opcionalmente además en una o más de una posición dada P, P', P'', etc., en uno cualquiera de los aminoácidos de un grupo dado proporcionará resultados similares. En base a la Tabla 1, dichos grupos dados pueden definirse de la siguiente manera:

- 5
- 10
- aminoácidos alifáticos hidrofóbicos: Met, Ile, Leu y Val
 - aminoácidos aromáticos hidrofóbicos: Phe
 - aminoácidos ácidos hidrófilos: Asp, Glu, Asn y Gln
 - aminoácidos básicos hidrófilos: Arg, Lys e His
 - aminoácidos alifáticos moderadamente hidrofóbicos: Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Pro
- 15
- aminoácidos aromáticos moderadamente hidrofóbicos: Tyr y Trp.

De estos, y para el fin de la mutación, Cys y Pro pueden ser aminoácidos sustitutos menos favorables de aminoácidos de plasmina o plasminógeno de tipo natural debido a la creación del posible grupo tiol libre por Cys, o debido a la alteración más extensa de la estructura de la proteína por Pro. Otras sustituciones de aminoácidos incluyen la mutación de un aminoácido de tipo natural en una posición [P+/-n], y opcionalmente además, en una o más de una posición P, P', P'', etc., de un dominio catalítico de plasmina(plasminógeno) en un aminoácido no natural o no canónico, o en análogos de aminoácidos, tales como norleucina, norvalina, ornitina o citrulina (para un listado más extenso véase, p. ej., Hendrickson *et al.* 2004, *Annu Rev Biochem* 73, 147-176).

25

Tabla 1. Características de los aminoácidos.

Aminoácidos			Polaridad de la cadena lateral	Carga de la cadena lateral (en pH 7)	Índice hidropático
Alanina	Ala	A	no polar	neutral	1,8
Arginina	Arg	R	polar	positiva	-4,5
Asparagina	Asn	N	polar	neutral	-3,5
Ácido aspártico	Asp	D	polar	negativa	-3,5
Cisteína	Cys	C	no polar	neutral	2,5
Ácido glutámico	Glu	E	polar	negativa	-3,5
Glutamina	Gln	Q	polar	neutral	-3,5
Glicina	Gly	G	no polar	neutral	-0,4
Histidina	His	H	polar	positiva	-3,2
Isoleucina	Ile	I	no polar	neutral	4,5
Leucina	Leu	L	no polar	neutral	3,8
Lisina	Lys	K	polar	positiva	-3,9
Metionina	Met	M	no polar	neutral	1,9
Fenilalanina	Phe	F	no polar	neutral	2,8
Prolina	Pro	P	no polar	neutral	-1,6
Serina	Ser	S	polar	neutral	-0,8
Treonina	Thr	T	polar	neutral	-0,7
Triptófano	Trp	W	no polar	neutral	-0,9
Tirosina	Tyr	Y	polar	neutral	-1,3
Valina	Val	V	no polar	neutral	4,2

En las condiciones del ensayo (degradación autoproteolítica no forzada en pH neutro) como se describe en la solicitud de patente internacional n.º PCT/EP2010/059902, un número limitado de escisiones autoproteolíticas se produce en el dominio catalítico de la plasmina. Estas escisiones se produjeron en lisina 137 del dominio catalítico de plasmina humana, en lisina 147 del dominio catalítico de plasmina humana y en arginina 158 del dominio catalítico de plasmina humana. Esto, sin embargo, no excluye la posibilidad de la existencia de otros enlaces peptídicos que se escinden autoproteolíticamente.

30

Por consiguiente, en relación con las variantes de plasminógeno, variantes de plasmina, o derivados de plasmina según la invención, estos pueden comprender adicionalmente en su dominio catalítico la mutación de un aminoácido lisina o arginina seleccionado entre:

35

(i) lisina en la posición 137 del dominio catalítico de plasmina humana, o lisina o arginina correspondiente de una plasmina no humana;

40

(ii) lisina en la posición 147 del dominio catalítico de plasmina humana, o lisina o arginina correspondiente de una plasmina no humana; y/o

(iii) arginina en la posición 158 del dominio catalítico de plasmina humana, o lisina o arginina correspondiente de una plasmina no humana;

en el que dicho dominio catalítico de plasmina humana comienza por el aminoácido valina en la posición 1, que es el mismo aminoácido valina que aparece en la posición 562 de Glu-plasminógeno humano. Para esclarecer la numeración de los aminoácidos en el plasminógeno humano y el dominio catalítico de plasmina humana, se hace referencia a la Figura 1 en el presente documento.

En particular, en lo anterior, dicho

glutamato en la posición 138 del dominio catalítico de plasmina humana, o el resto de aminoácido correspondiente de una plasmina no humana se muta en otro aminoácido ácido hidrófilo, p. ej., aspartato, asparagina o glutamina.

La identificación de un aminoácido en una secuencia de plasmina(plasminógeno) no humano que "corresponde a" (es decir, la identificación de un aminoácido "correspondiente") un aminoácido en la plasmina(plasminógeno) humano implica primero la alineación de ambas secuencias aminoácidas. Dicha alineación puede requerir alguna optimización, como la introducción de huecos menores en una o ambas de las secuencias alineadas, para dar lugar a la identidad y homología más alta. En segundo lugar, se identifica el aminoácido en la plasmina(plasminógeno) no humano alineándose con el aminoácido en la plasmina(plasminógeno) humano y en el presente documento se refiere como el aminoácido "correspondiente". La Figura 2 en el presente documento representa una alineación de secuencias proteicas de plasminógeno de mamífero disponibles públicamente, y destaca los aminoácidos de particular interés en la actual invención en la secuencia de plasminógeno humano (línea 1) junto con los aminoácidos correspondientes en las secuencias de plasminógeno no humano (líneas 2-18). Los aminoácidos de particular interés son Lys en la posición 698 (posición 137 en el dominio catalítico, véase la Figura 1), Lys en la posición 708 (posición 147 en el dominio catalítico, véase la Figura 1) y Arg en la posición 719 (posición 158 en el dominio catalítico, véase la Figura 1).

"Plasmina", también conocida como fibrinolisisa o lisofibrina, es una proteasa tipo serina que resulta de la activación del plasminógeno zimógeno. La activación es el resultado de una escisión proteolítica entre los aminoácidos 561 y 562 (numeración relativa al Glu-plasminógeno humano). La plasmina lleva una cadena pesada que comprende 5 dominios kringle y una cadena ligera que comprende el dominio catalítico. El plasminógeno puede enriquecerse a partir del plasma sanguíneo, p. ej., mediante cromatografía por afinidad de lisina (Deutsch y Mertz, 1970, *Science* 170, 1095-1096). El truncamiento de la molécula de la plasmina (fuera y/o en el dominio catalítico de plasmina) es posible siempre y cuando el dominio catalítico siga siendo funcional, dicho truncamiento da lugar por consiguiente a la formación de un "derivado proteolíticamente activo" de plasmina. Como tal, uno o más de los 5 dominios kringle pueden eliminarse total o parcialmente. Las plasminas truncadas que carecen de uno o más dominios kringle y/o partes que carecen de uno o más dominios kringle, se conciben por tanto en la presente invención como ejemplos de derivados proteolíticamente activos de plasmina. Ejemplos de variantes truncadas de plasmina incluyen, entre otros, "midiplasmina", "miniplasmina", "microplasmina", y "deltaplasmina". La midiplasmina carece básicamente de los dominios kringle 1 a 3 (p. ej., Christensen *et al.*, 1995, *Biochem J* 305, 97-102). La miniplasmina se obtuvo originalmente por digestión limitada de plasmina con elastasa y carece básicamente de los dominios kringle 1 a 4 (p. ej., Christensen *et al.*, 1979, *Biochim Biophys Acta* 567, 472-481; Powell y Castellino, 1980, *J Biol Chem* 255, 5329). La miniplasmina se ha producido posteriormente de forma recombinante (documento WO 2002/050290). La microplasmina se obtuvo originalmente mediante incubación de plasmina en un pH elevado y carece básicamente de todos los dominios kringle (p. ej., documento WO 89/01336). Mientras que la microplasmina obtenida a partir de la incubación de plasmina en un pH elevado contiene los aminoácidos carboxi-terminales 30-31 de la cadena pesada, una variante de microplasmina producida de forma recombinante contiene los aminoácidos carboxi-terminales 19 de la cadena pesada (WO 2002/050290). Esto ilustra la variabilidad molecular permitida en un género de plasmina dado como el género de microplasmina (p. ej., especies múltiples forman el género de microplasmina). La deltaplasmina es una versión recombinante de plasmina en la que el dominio kringle 1 o dominio kringle 4 se vincula directamente al dominio catalítico (documento WO 2005/105990). Las variantes truncadas descritas previamente de la plasmina se obtienen por activación de "midiplasminógeno", "miniplasminógeno", "microplasminógeno" y "deltaplasminógeno", respectivamente. Con el fin de ser activable, un plasminógeno truncado necesita comprender un número mínimo de aminoácidos del enlazador entre el dominio kringle (como dominio kringle 5 en miniplasmina) y el dominio catalítico, o C-terminal del dominio catalítico en caso de plasmina truncada sin kringle (véase, p. ej., Wang *et al.*, 1995, *Protein Science* 4, 1758-1767). En el contexto de la presente invención puede desearse que el plasminógeno comprenda un "sitio de activación intacto", que implica que al menos están presentes los aminoácidos 561 y 562 (en relación con Glu-plasminógeno humano, o los aminoácidos correspondientes de plasminógeno no humano) y están presentes en un contexto molecular de modo tal que puede producirse la activación/conversión de plasminógeno a plasmina, aunque posiblemente con diferentes cinéticas, ya que se produce en plasmina de tipo natural. Como alternativa a la plasmina o una variante truncada activa de la misma, un plasminógeno activable o una variante truncada de la misma puede utilizarse en el contexto de la actual invención (véase, p. ej., los documentos EP 0480906, US 5.304.383; EP 0631786, US 5.520.912, US 5.597.800, US 5.776.452). El "plasminógeno" se refiere a cualquier forma de plasminógeno p. ej., Glu-plasminógeno o Lys-plasminógeno (comenzando con Arg en la posición 68 o Lys en las posiciones 77 o 78). Al utilizar plasminógeno

activable o una variante truncada activable del mismo, la activación a plasmina puede retrasarse y producirse generalmente tras ponerse en contacto con un órgano, tejido o fluido corporal, es decir, tras la administración a un sujeto. En otra alternativa, la plasmina o una variante truncada activa de la misma puede sustituirse en el contexto de la actual invención con un plasminógeno activable o una variante truncada activable del mismo conjuntamente con un activador de plasminógeno (tal como activador de plasminógeno tisular (APt), uroquinasa, estreptoquinasa o estafiloquinasa, o cualquier variante de los mismos; véase, p. ej., los documentos US 6.733.750, US 6.585.972, US 6.899.877; WO 03/33019). En una alternativa adicional, una mezcla de cualquiera de (i) plasmina o derivado de la misma, (ii) plasminógeno activable o un derivado activable del mismo, y, opcionalmente (iii) un activador de plasminógeno pueden utilizarse en el contexto de la actual invención (véase, p. ej., el documento US 2004/0081643). Con el fin de asegurar la estabilidad de la plasmina (o plasminógeno), por lo general se almacenará a temperaturas bajas (p. ej., +4 grados Celsius o -20 grados Celsius). La composición de almacenamiento puede ser una composición estabilizante, tal como una composición de bajo pH (pH 4 o inferior; obtenida p. ej., mediante 1 mM a 250 mM de un ácido, tal como ácido cítrico, véase, p. ej., Castellino y Sodetz, 1976, *Methods Enzymol* 45, 273-286; documentos WO 01/36608; WO 01/36609; WO 01/36611) o una composición con alto contenido en glicerol (30-50 % v/v, p. ej., Castellino y Sodetz, 1976, *Methods Enzymol* 45, 273-286), alternativamente o junto con una o más composiciones estabilizantes que comprenden además p. ej., un aminoácido (p. ej. lisina o un análogo de la misma, tal como EACA o ácido tranexámico), un azúcar (p. ej., manitol) o cualquier estabilizador conocido en la materia (p. ej., dipéptidos, documento WO 97/01631). Se incluye además en el género "plasmina" cualquier derivado activo de la misma (o de una variante de plasmina truncada activa), o un derivado similar de plasminógeno activable (o variante truncada activable del mismo). Dichos derivados incluyen p. ej., plasmina o plasminógeno marcado (o variantes truncadas de los mismos) tales como plasmina marcada con Tc⁹⁹ (Deacon *et al.*, 1980, *Br J Radiol* 53, 673-677) o plasmina o plasminógeno pegilado o acilado (o variantes truncadas de los mismos; documentos EP 9879, WO 93/15189) Cualquier otro marcador (radiactivo, fluorescente, etc.) puede emplearse igualmente para producir un derivado de plasmina o plasminógeno. Dichos derivados incluyen además moléculas de plasmina o plasminógeno híbridas o quiméricas que comprenden p. ej., una plasmina o plasminógeno truncados según la invención fusionada con, p. ej., una molécula de unión a fibrina (como kringle 2 de APt, un kringle de apolipoproteína, el dominio tipo dedo de APt o fibronectina o el dominio Fab de un anticuerpo de unión a fibrina).

La comparación de la resistencia autoproteolítica (es decir, estabilidad) de plasmina de tipo natural y de las variantes de plasmina o derivados de plasmina según la invención puede realizarse de manera similar a la comparación de la actividad proteolítica, p. ej., en un ensayo de actividad cromogénico o un ensayo de sustrato biológico basado en p. ej., fibrina, fibrinógeno, fibronectina, gelatina, laminina o colágeno.

Con el fin de determinar la resistencia autoproteolítica, puede determinarse la constante de velocidad de la autólisis. Se prevé que las variantes de plasmina según la invención, incluyendo las plasminas obtenidas de las variantes de plasminógeno según la invención, o cualquiera de los derivados de plasmina según la invención pueden caracterizarse mediante una constante de velocidad de autólisis que es al menos 5 %, o al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 99,5 % inferior a la constante de velocidad de autólisis de plasmina de tipo natural, o, alternativamente, por una constante de velocidad de autólisis que es como máximo 95 %, o como máximo 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, o 90 % de la constante de velocidad de autólisis de plasmina de tipo natural. Con el fin de determinar el porcentaje indicado, el cálculo puede realizarse en base a los números de las constantes de velocidad absoluta de autólisis. Por ejemplo, una constante de velocidad de autólisis de 123 M⁻¹s⁻¹ se determinó para microplasmina de tipo natural, mientras que para la variante de microplasmina E138Q se determinó una constante de velocidad de autólisis de 4 M⁻¹s⁻¹ (véase el Ejemplo 1/Tabla 2). La constante de velocidad de autólisis de la variante E138Q es por lo tanto 3,25 % de la constante de velocidad de autólisis de microplasmina de tipo natural.

Además, cualquiera de las variantes de plasmina según la invención, incluyendo las plasminas obtenidas a partir de las variantes de plasminógeno según la invención, o derivados de cualquiera de dichas plasminas pueden retener la actividad proteolítica diferente (mayor o menor) de la actividad proteolítica de plasmina de tipo natural, como se determina p. ej., con un ensayo de actividad cromogénico o un ensayo de sustrato biológico basado en p. ej., fibrina, fibrinógeno, fibronectina, gelatina, laminina o colágeno.

Las actividades proteolíticas de las variantes de plasmina según la invención, incluyendo las plasminas obtenidas a partir de las variantes de plasminógeno según la invención, o cualquiera de los derivados de plasmina según la invención pueden compararse con la actividad proteolítica de plasmina de tipo natural por medio de la constante catalítica k_{cat} que es una medida de la cantidad de moléculas del sustrato de cada sitio de la enzima que se convierte al producto por unidad de tiempo. Por consiguiente, cualquiera de las variantes de plasmina según la invención, incluyendo las plasminas obtenidas a partir de las variantes de plasminógeno según la invención, o cualquiera de los derivados de plasmina según la invención pueden caracterizarse mediante un valor k_{cat} que se encuentra en el intervalo de +100 % a -90 %, o +50 % a -50 % del valor k_{cat} de plasmina de tipo natural, es decir, caracterizados por un valor k_{cat} en el intervalo de 10 % a 200 %, o 50 % a 150 % del valor k_{cat} de plasmina de tipo natural. Con el fin de determinar el porcentaje indicado, el cálculo se realiza en los números k_{cat} absolutos. Por ejemplo, la microplasmina de tipo natural tiene un k_{cat} de 46 s⁻¹, mientras que la variante de microplasmina K137M tiene un k_{cat} de 36s⁻¹ (véase

el Ejemplo 4/Tabla 3 de la solicitud de patente internacional n.º PCT/EP2010/059902). El k_{cat} de la variante K137M es por lo tanto 78,3 % de k_{cat} de microplasmina de tipo natural.

Otra forma de comparación de la actividad proteolítica de las variantes de plasmina según la invención, incluye las plasminas obtenidas a partir de las variantes de plasminógeno según la invención, o cualquiera de los derivados de plasmina según la invención a la actividad proteolítica de plasmina de tipo natural que incluye la comparación de k_{cat}/K_m . Aunque los valores k_{cat}/K_m mayores, comparables o ligeramente inferiores pueden resultar preferentes, hasta 1.000 veces o hasta 500 veces inferior a k_{cat}/K_m de variantes de plasmina según la invención, incluyendo las plasminas obtenidas a partir de las variantes de plasminógeno según la invención, o cualquiera de los derivados de plasmina según la invención en comparación con k_{cat}/K_m de plasmina de tipo natural aún pueden ser aceptables (véase más adelante). A modo de ejemplo, el k_{cat}/K_m de la variante de microplasmina E138Q se determinó que era $9,5 \times 10^5$ mientras que el k_{cat}/K_m de plasmina de tipo natural se determinó que era $6,9 \times 10^5$ (véase el Ejemplo 1/Tabla 2), es decir, el valor k_{cat}/K_m de microplasmina E138Q es 1,38 veces mayor que el valor k_{cat}/K_m de microplasmina de tipo natural.

Alternativamente, cualquiera de las variantes de plasmina según la invención, incluyendo las plasminas obtenidas a partir de las variantes de plasminógeno según la invención, o cualquiera de los derivados de plasmina según la invención pueden compararse con la plasmina de tipo natural mediante la combinación de los datos de la constante de velocidad autolítica y los datos k_{cat}/K_m . Por ejemplo, una variante de plasmina con una constante de velocidad autolítica 20 veces menor en comparación con la plasmina de tipo natural, y con k_{cat}/K_m 10 veces menor en comparación con la plasmina de tipo natural será 2 veces mejor que la plasmina de tipo natural. Obviamente, dependiendo del uso final, una plasmina muy estable (es decir, sin o casi sin degradación autoproteolítica) con baja actividad proteolítica puede ser muy deseada, p. ej., en casos en los que se desea baja actividad de plasmina pero prolongada o incluso requerida para conseguir el efecto clínico previsto. Dichas variantes de plasmina muy estable con baja actividad proteolítica serían como las formulaciones de liberación lenta prácticamente iguales sin la necesidad real de utilizar en efecto un transportador o adyuvante de liberación lenta.

Otra alternativa para comparar cualquiera de las variantes de plasmina según la invención, incluyendo las plasminas obtenidas a partir de las variantes de plasminógeno según la invención, o cualquiera de los derivados de plasmina según la invención pueden compararse con la plasmina de tipo natural mediante la combinación de los datos de la constante de velocidad autolítica y los datos de k_{cat} .

Además, cualquiera de las variantes de plasmina según la invención, incluyendo las plasminas obtenidas a partir de las variantes de plasminógeno según la invención, o cualquiera de los derivados de plasmina según la invención pueden caracterizarse mediante cualquier combinación de la constante de velocidad de autólisis previamente definida, constante catalítica k_{cat} y/o k_{cat}/K_m .

Obviamente, para cualquier medición comparativa, tal como la descrita previamente, es deseable comparar variantes de plasmina con su plasmina de tipo natural más próxima, p. ej., comparar una variante de microplasmina con una microplasmina de tipo natural, o una variante de miniplasmina con una miniplasmina de tipo natural. Además resulta obvio, para cualquier medición de la actividad, un derivado inactivado de forma reversible de una variante de plasmina según la invención debe primero activarse mediante la eliminación de la causa de la inactivación reversible (p. ej., acilación o pH no óptimo).

Cualquiera de las variantes de plasminógeno según la invención o plasminas obtenidas de los mismos, de las variantes de plasmina según la invención pueden ser Glu-plasminógeno de Glu-plasmina, Lys-plasminógeno o Lys-plasmina, midiplasminógeno o midiplasmina, miniplasminógeno o miniplasmina, microplasminógeno o microplasmina, deltaplasminógeno o deltaplasmina.

Existen numerosos ensayos para determinar si una especie de plasmina es o no proteolíticamente activa. Los ensayos fáciles y simples se basan en la digestión de un sustrato cromogénico por la plasmina presente en una muestra; los sustratos cromogénicos incluyen S-2403 (Glu-Phe-Lys-pNA) y S-2251 (Val-Leu-Lys-pNA) que liberan p-nitroanilina (pNA) tras la escisión proteolítica. La cantidad de pNA formada puede medirse por absorbancia luminosa a 405 nm. Un ensayo alternativo para determinar la actividad de la plasmina es un ensayo potenciométrico. Los ensayos colorimétricos (utilizando un sustrato cromogénico) y potenciométricos se describen en, p. ej., Castellino y Sodetz (1976, *Methods Enzymol* 45, 273-286). Un ensayo alternativo adicional para determinar la actividad de la plasmina es un ensayo caseinolítico (p. ej., Robbins y Summaria, 1970, *Methods Enzymol* 19, 184-199; Ruyssen y Lauwers, 1978, Capítulo IX - Plasmina, en "*Pharmaceutical Enzymes*", Story-Scientia, Gent, Bélgica, págs. 123-131). Otro ensayo alternativo para determinar la actividad de la plasmina es un ensayo fibrinolítico (p. ej., Astrup y Mullertz, 1952, *Arch Biochem Biophys* 40, 346-351). Otros ensayos de actividad adicionales podrían concebirse fácilmente empleando otros sustratos proteicos. Claramente, dichos ensayos también pueden emplearse para seguir la desaparición de la actividad proteolítica de la plasmina con el tiempo debido a la degradación autoproteolítica de la enzima. Como alternativa para evaluar la estabilidad de una variante de plasmina o cualquier variante truncada activa o derivado de la misma de la actual invención, dicha variante de plasmina puede incubarse en presencia de plasmina de tipo natural y puede controlarse la resistencia de la variante de plasmina en la digestión por plasmina de tipo natural.

El uso de la plasmina en la eliminación de elementos necróticos o restos de lesiones, heridas, heridas ulcerantes (tales como heridas ulcerosas suturadas), etc. se ha descrito p. ej., en el documento US 3.208.908. Del mismo modo, la aplicación tópica de las preparaciones terapéuticas que comprenden plasmina para el tratamiento de quemaduras se divulga p. ej. en el documento US 4.122.158. El desbridamiento se refiere a la eliminación de tejido muerto, dañado y/o infectado con el fin de mejorar o aumentar la cicatrización de los tejidos sanos restantes. Dicha eliminación puede obtenerse por medios quirúrgicos, mecánicos o químicos, o por medio de ciertas especies de gusanos vivos que se alimentan de forma selectiva del tejido necrótico (terapia larval). El desbridamiento también puede realizarse utilizando enzimas o puede asistirse por enzimas, un proceso referido como desbridamiento enzimático. El desbridamiento es un aspecto importante en el proceso de cicatrización de quemaduras y otras heridas graves y se utiliza también en el tratamiento de algunos tipos de mordeduras de serpiente. La aplicación de plasmina (o de cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa como se ha descrito previamente) en el desbridamiento enzimático (solo o en combinación con otros tipos de desbridamiento) es particularmente útil al favorecer o facilitar la cicatrización de heridas y como un adjunto en los procedimientos quirúrgicos, tales como injerto cutáneo.

Un uso más conocido de plasmina (o de cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa como se ha descrito previamente) se refiere en términos generales al tratamiento de (a) depósito(s) patológico(s) de fibrina. Los depósitos de fibrina pueden ser resultado de una amplia variedad de situaciones patológicas en el cuerpo. Por ejemplo, los coágulos de sangre que contienen fibrina pueden formarse en los vasos sanguíneos en el tejido resultante de una vena profunda, arteria coronaria, arteria cerebral u oclusión venosa retiniana o trombosis. Las pequeñas acumulaciones de fibrina preceden, y pueden proporcionar, la advertencia de la trombosis catastrófica inminente. Los ejemplos incluyen angina de pecho inestable, que se considera una advertencia de la trombosis coronaria inminente y ataques isquémicos transitorios, que pueden preceder a apoplejías. La fibrina se deposita además, con frecuencia en el tejido en asociación con la inflamación asociada con muchos procesos de enfermedad que incluyen infección, enfermedad autoinmunitaria y cáncer. Otra situación en la que se deposita fibrina es entorno a abscesos causados por la infección con microorganismos. Los depósitos de fibrina, además con frecuencia se encuentran asociados con ciertos tumores sólidos. La deposición de fibrina también puede ocurrir durante la cicatrización de cualquier tipo de herida, incluyendo las resultantes de la intervención quirúrgica, incluyendo, p. ej. trabeculectomía. Otra situación de la deposición de fibrina es la acumulación de fibrina en una vena retiniana, que puede conducir a la degeneración retiniana, alteración de la visión o incluso la pérdida de la visión. El término depósito patológico de fibrina abarca además dichos depósitos formados o presentes o en la punta de un catéter, el dispositivo de catéter u otro implante, tal como los vasos sanguíneos protésicos e injertos de origen sintético, humano o animal y se bloquean efectivamente por una oclusión que comprende fibrina. El término "dispositivo de catéter" se refiere a cualquier catéter o dispositivo que puede entrar en el cuerpo, incluyendo catéteres arteriales, catéteres cardíacos, catéteres venosos centrales, catéteres intravenosos, catéteres centrales de inserción periférica, catéteres arteriales pulmonares, catéteres venosos centrales en forma de túnel, y derivaciones arteriovenosas.

Entre los diversos factores que favorecen el proceso de trombosis, es decir, la formación de un tapón de trombo o hemostático, se encuentran: (1) daños en el revestimiento de las células endoteliales del vaso sanguíneo afectado, (2) un aumento en las propiedades de coagulación de la sangre, y (3) estasis sanguínea en el vaso sanguíneo afectado. La trombosis puede comenzar como un bulto muy pequeño unido a la parte dañada del revestimiento del vaso sanguíneo. Su presencia estimula además a que se produzca la trombosis, y tiene el efecto de causar una ralentización del flujo sanguíneo mediante la reducción del diámetro interno del vaso sanguíneo. A menudo el crecimiento adicional del trombo pequeño da lugar inicialmente a la obstrucción completa o casi completa del vaso sanguíneo afectado. Si la trombosis ocurre en una de las arterias, los tejidos irrigados por la arteria pueden privarse de oxígeno y nutrientes, causando daño o muerte del tejido (gangrena). La severidad del daño depende de la posición y el tamaño de la trombosis, la velocidad a la que crece y si el área afectada tiene solo una arteria o está irrigada por los vasos sanguíneos colaterales. Si se ve afectado el vaso sanguíneo de un órgano vital, p. ej., corazón o cerebro, la persona puede lesionarse gravemente o fallecer. Eventualmente, un trombo puede contener organismos infecciosos, tales como bacterias, y puede producirse trombosis séptica, con la formación de pus e infección de los tejidos circundantes.

Los usos adicionales de la plasmina (o de cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa como se ha descrito previamente) incluyen la reducción del nivel de fibrinógeno circulante (p. ej., documento WO 93/07893) y su uso como inhibidor de α 2-antiplasmina (descrito para reducir el tamaño del infarto cerebral tras la apoplejía isquémica; documento WO 00/18436).

Otro uso de la plasmina (o de cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa como se ha descrito previamente) se relaciona con la inducción del desprendimiento vítreo posterior (DVP) y/o licuefacción vítrea en el ojo como alternativa o como adjunto a la vitrectomía mecánica (documentos WO 2004/052228, US 6.733.750, US 6.585.972, US 6.899.877; WO 03/33019; WO 2006/122249; WO 2007/047874, US 5.304.118, US 2006/0024349, US 2003/0147877). La vitrectomía y/o licuefacción del vítreo es beneficiosa para una serie de afecciones oculares, tales como flotadores vítreos (residuos móviles/depositos de vítreo en el humor vítreo normalmente transparente que puede deteriorar la visión), desprendimiento de retina (una afección cegadora que pueden causarse por tracción vítrea), pliegue macular (tejido cicatricial en la mácula; la mácula se requiere para la visión aguda, central; el pliegue macular también se conoce como membrana epi- o prerretiniana, maculopatía celofán, arruga de la retina,

retinopatía de superficie arrugada, fibrosis premacular, o enfermedad de la membrana limitante interna), retinopatía diabética (proliferativa o no proliferativa) que puede dar lugar a hemorragia vítrea y/o formación de tejido cicatricial fibroso en la retina (que puede causar desprendimiento de retina), orificios maculares (orificio en la mácula que provoca un punto ciego y causado por tracción vítrea, lesión o un acontecimiento traumático), hemorragia vítrea (causada por retinopatía diabética, lesiones, desprendimiento de retina o desgarros retinianos, hemorragias subaracnoideas (síndrome de Terson), o vasos sanguíneos obstruidos), hemorragia subhialoidea (sangrado bajo la membrana hialoidea que envuelve el vítreo), edema macular (depósito de fluido y proteínas en o bajo la mácula del ojo) y degeneración macular (que comienza con la formación de drusas; se presenta en forma seca y húmeda; en caso de relacionarse con la edad se denomina degeneración macular asociada a la edad). Otras aplicaciones oculares de plasmina incluyen el mantenimiento o rescate de una ampolla de filtración tras la cirugía de trabeculectomía (realizada para reducir la presión intraocular), véase p. ej., el documento WO 2011/023805.

Otro uso adicional de la plasmina (o de cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa como se ha descrito previamente) reside en el diagnóstico, más particularmente plasmina marcada de forma apropiada (p. ej., marcada por Tc⁹⁹, véase anteriormente) (o cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa como se ha descrito previamente) puede aplicarse para la detección de depósitos patológicos de fibrina. Cuando se aplica una variante de plasmina truncada o de plasminógeno según la actual invención en dicho diagnóstico, deben extremarse precauciones ya que dicha variante aún comprende un sitio de unión a fibrina (sea o no de la propia plasmina o añadida, p. ej. al dominio catalítico de plasmina mediante la creación de una molécula híbrida).

La plasmina o cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa según la invención puede almacenarse en un transportador, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Dicho transportador, diluyente o adyuvante puede consistir o comprender un tampón ácido bajo, tal como 1-100 mM de acetato o citrato. Cuando sea ácido, el transportador, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable, puede tener un pH de 2,5 a 5,0, tal como un pH de 2,5 a 4,0, o, tal como un pH de 3,0 a 3,5, o como un pH de 3,1 o 3,2 o 3,3 o 3,4. Los compuestos ácidos útiles incluyen ácido acético, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico o ácido benzoico. El ácido fórmico puede emplearse pero ha de tenerse especial precaución de que este compuesto no induzca la escisión proteolítica en el extremo C-terminal de los residuos Asp. El transportador, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable, cuando sea ácido, neutro o básico, puede comprender uno o más aminoácidos, tales como serina, treonina, metionina, glutamina, glicina, isoleucina, valina, alanina, ácido aspártico, lisina, histidina o cualquier derivado o análogos de los mismos. El transportador, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable puede comprender un carbohidrato, tal como un monosacárido, disacárido, polisacárido o alcohol polihídrico. Ejemplos incluyen azúcares, tales como sacarosa, glucosa, fructosa, lactosa, trehalosa, maltosa y manosa, alcoholes de azúcar, tales como sorbitol, manitol y polisacáridos, tales como dextrinas, dextranos, glicógeno, almidones y celulosas. El transportador, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable, puede comprender compuestos, tales como glicerol, niacinamida, glucosamina, tiamina, citrulina, sales inorgánicas (tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio), alcohol bencílico o ácido benzoico. El transportador, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable, puede comprender compuestos, tales como ácido ϵ -aminocaproico (EACA) y/o ácido tranexámico (véase también previamente y la sección de Antecedentes). Algunos de estos compuestos pueden utilizarse como estabilizadores de una plasmina o cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa como se ha descrito previamente.

En vista de lo anterior, otro aspecto de la invención se refiere a plasminógeno, plasmina, o cualquier variante aislados o derivado de los mismos o por lo tanto alternativa según la invención, o una combinación de cualquiera de los mismos para su uso como medicamento.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a composiciones que comprenden el plasminógeno, plasmina aislados, o cualquier variante o derivado de los mismos o por lo tanto alternativa según la invención, o una combinación de cualquiera de los mismos, y al menos uno de un diluyente, transportador o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, dicha composición puede comprender adicionalmente al menos uno de un anticoagulante, un agente trombolítico adicional, un agente antiinflamatorio, un agente antiviral, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, un antihistamínico o un anestésico.

En una realización con respecto a los dos aspectos previamente descritos de la invención, el plasminógeno, plasmina aislados, o cualquier variante o derivado de los mismos o por lo tanto alternativa según la invención, o de una combinación de cualquiera de los mismos, o la composición según la invención puede utilizarse en cualquier entorno clínicamente relevante, tal como el uso en el tratamiento de un depósito patológico de fibrina, su uso en la inducción de desprendimiento vítreo posterior en el ojo, su uso en la inducción de la licuefacción del vítreo en el ojo, su uso como adjunto y facilitación de la vitrectomía en el ojo, su uso en la inducción de desprendimiento vítreo posterior, su uso en la resolución de adhesión vitreomacular, su uso en el cierre de orificios maculares, su uso en el desbridamiento enzimático, su uso en la reducción de fibrinógeno circulante, su uso en la reducción de los niveles alfa2-antiplasmina, o su uso junto con la trabeculectomía.

En otra realización con respecto a los dos aspectos previamente descritos de la invención, el plasminógeno, plasmina aislados, o cualquier variante o derivado de los mismos o por lo tanto alternativa según la invención, o de una combinación de cualquiera de los mismos, o la composición según la invención puede utilizarse con fines

5 profilácticos o en métodos para el tratamiento profiláctico. Los usos profilácticos incluyen la reducción del riesgo de desarrollo de un depósito patológico de fibrina en un mamífero que presenta un mayor riesgo de desarrollarlo (tal como un mamífero obeso, un mamífero que no realiza suficiente ejercicio físico o un mamífero programado para someterse a un acontecimiento quirúrgico mayor u operación). Otros usos profilácticos incluyen la inducción del desprendimiento vítreo posterior y/o licuefacción vítreo en un ojo aparentemente sano de un mamífero cuyo ojo compañero se diagnostica/se diagnosticó para requerir la inducción del desprendimiento vítreo posterior y/o licuefacción vítreo.

10 Alternativamente, la invención se refiere a métodos para el tratamiento, disolución, distensión, maceración, lisis, inducción o favorecimiento de la lisis de un depósito patológico de fibrina en un sujeto, dichos métodos comprenden poner en contacto dicho depósito de fibrina con una cantidad eficaz del plasminógeno, plasmina aislados, o cualquier variante o derivado de los mismos o por lo tanto alternativa según la invención, o de una combinación de cualquiera de los mismos, dicho contacto resulta en el tratamiento, disolución, distensión, maceración, lisis, o inducción o favorecimiento de la lisis de dicho depósito patológico de fibrina.

15 La invención se refiere además a métodos para inducir el desprendimiento vítreo posterior en el ojo y/o para inducir la licuefacción del vítreo en el ojo, o para facilitar la vitrectomía quirúrgica en el ojo de un sujeto, comprendiendo dichos métodos poner en contacto un ojo de dicho sujeto en necesidad de dicho tratamiento con una cantidad eficaz del plasminógeno, plasmina aislados, o cualquier variante o derivado de los mismos o por lo tanto alternativa según la invención o de una combinación de cualquiera de los mismos, dicho contacto resulta en la inducción de dicho desprendimiento vítreo posterior y/o de dicha licuefacción del vítreo, o en la facilitación de dicha vitrectomía quirúrgica.

20 La invención también se refiere a métodos para el desbridamiento enzimático de tejido lesionado de un sujeto, comprendiendo dicho método poner en contacto dicho tejido lesionado con una cantidad eficaz del plasminógeno, plasmina aislados, o cualquier variante o derivado de los mismos o por lo tanto alternativa según la invención, o de una combinación de cualquiera de los mismos, dicho contacto resulta en dicho desbridamiento enzimático de dicho tejido lesionado.

25 Otros métodos de la invención son el tratamiento o la prevención de cualquier otra indicación clínicamente relevante, incluyendo métodos para la reducción de fibrinógeno circulante, o para reducir los niveles de α 2-antiplasmina en un sujeto, comprendiendo dichos métodos poner en contacto un sujeto en necesidad de dicho tratamiento con una cantidad eficaz de plasminógeno, plasmina aislados, o cualquier variante o derivado de los mismos o por lo tanto alternativa según la invención, o de una combinación de cualquiera de los mismos, dicho contacto resulta en dicha reducción de fibrinógeno circulante o de dichos niveles de α 2-antiplasmina.

30 En general, el medicamento o composición de la invención comprende una plasmina (o cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa) según la invención puede, en función de su uso final y modo de administración, comprender uno o más principios activos adicionales, tales como un anticoagulante, un agente trombolítico adicional, un agente antiinflamatorio, un agente antiviral, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, un antihistamínico o anestésico.

35 "Anticoagulantes" incluyen hirudinas, heparinas, cumarinas, heparina de bajo peso molecular, inhibidores de trombina, inhibidores de plaquetas, inhibidores de la agregación plaquetaria, inhibidores de factores de coagulación, anticuerpos antifibrina e inhibidores del factor VIII (tales como los descritos en el documento WO 01/04269 y en el documento WO 2005/016455).

40 "Agentes trombolíticos" incluyen plasmina de tipo natural, plasminógeno de tipo natural, uroquinasa, estreptoquinasa, activador de plasminógeno tisular (APt o alteplasa), activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (APu) y estafiloquinasa o cualquier variante o derivado de cualquiera de los mismos, tal como CAPEA (complejo activador de plasminógeno estreptoquinasa anisoilado), reteplasa, tenecteplasa, APucu (APu cadena única), o una combinación de cualquiera de los mismos.

45 "Agentes antiinflamatorios" incluyen esteroides (p. ej., prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, prednisona, triamcinolona, dexametasona) y agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINEs, p. ej., acetaminofreno, ibuprofeno, aspirina).

"Agentes antivirales" incluyen trifluridina, vidarabina, aciclovir, valaciclovir, famciclovir y doxuridina.

50 "Agentes antibacterianos" o antibióticos incluyen ampicilina, penicilina, tetraciclina, oxitetraciclina, framisetina, gatifloxacina, gentamicina, tobramicina, bacitracina, neomicina y polimixina.

55 "Agentes antimicóticos/fungistáticos/antifúngicos" incluyen fluconazol, anfotericina, clotrimazol, econazol, itraconazol, miconazol, 5-fluorocitosina, ketoconazol y natamicina.

65

"Agentes antiangiogénicos" incluyen anticuerpos (o fragmentos de los mismos), tales como anticuerpos anti-FCEV (factor de crecimiento endotelial vascular) o anti-FCP (factor de crecimiento placentario) y agentes, tales como macugen (pegaptanib sódico), triptofanil ARNt sintetasa (TrpRS), acetato de anecortave, profármaco de combrestatina A4, AdFDPE (adenovector capaz de expresar el factor derivado del pigmento epitelial), trampa de FCEV, inhibidor del receptor 2 de FCEV, inhibidores de FCEV, F1CP o FCT-β, Sirolimus (rapamicina) y endostatina.

"Agentes antimitóticos" incluyen mitomicina C y 5-fluorouracilo.

"Antihistamínicos" incluye fumarato de ketitofeno y maleato de feniramina.

"Anestésicos" incluyen benzocaína, butambeno, dibucaína, lidocaína, oxibuprocaína, pramoxina, proparacaína, proximetacaína, tetracaína y ametocaína.

"Poner en contacto", cuando se emplea en el presente documento, significa cualquier modo de administración que da lugar a la interacción entre una composición, tal como un medicamento y el tejido, fluido corporal, órgano, organismo, etc., con el que se pone en contacto dicha composición. La interacción entre la composición y el tejido, fluido corporal, órgano, organismo, etc. puede producirse comenzando inmediatamente o casi inmediatamente con la administración de la composición, puede producirse durante un periodo prolongado de tiempo (comenzando inmediatamente o casi inmediatamente con la administración de la composición), o puede retrasarse con respecto al momento de la administración de la composición.

Se puede utilizar cualquier método de contacto con un depósito patológico de fibrina que proporciona (ya sea de inmediato, de forma retrasada o durante un periodo de tiempo prolongado) una cantidad eficaz de una plasmina (o cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa) a dicho depósito de fibrina. Si dicho depósito de fibrina se asocia con un coágulo sanguíneo, la plasmina (o cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa) puede administrarse por vía intraarterial, intravenosa, o localmente (a poca distancia del coágulo, o incluso en el coágulo) por medio de inyección y/o infusión y/o un catéter.

Cuando se utiliza la plasmina (o cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa) en el desbridamiento enzimático, puede incluirse en una composición tipo gel capaz de aplicarse por vía tópica, o puede aplicarse en forma líquida.

Se puede utilizar cualquier método de contacto con el humor vítreo y/o acuoso en el ojo que proporcione (ya sea de inmediato, de forma retrasada o durante un periodo de tiempo prolongado) una cantidad eficaz de una plasmina (o cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa) para el humor vítreo y/o acuoso. Un método de puesta en contacto con el humor vítreo y/o acuoso se realiza por medio de una o más inyecciones intraoculares directamente en el humor vítreo y/o acuoso. Alternativamente, dicha puesta en contacto puede implicar inyecciones subconjuntivales, intramusculares o intravenosas. Un método de contacto alternativo adicional consiste en colocar un dispositivo implantable intravítreo como OCUSERT® (Alza Corp., Palo Alto, California) o VITRASERT® (Bausch y Lomb Inc., Rochester, Nueva York). Poner en contacto el humor vítreo y/o acuoso con una cantidad eficaz de una plasmina (o cualquier variante o derivado de la misma por lo tanto o alternativa) puede realizarse de forma continua utilizando un depósito, formulación de liberación sostenida o cualquier dispositivo implantable adecuado a la misma.

El término "cantidad eficaz" se refiere al régimen de dosificación del medicamento según la invención, en particular del principio activo del medicamento de acuerdo con la invención, es decir, plasmina o una variante truncada activa de la misma (o por tanto cualquier alternativa como se ha descrito previamente). La cantidad eficaz dependerá en general y necesitará el ajuste al modo de contacto o administración y afección a tratar. La cantidad eficaz del medicamento, más particular, su principio activo, es la cantidad requerida para obtener el resultado clínico o el efecto terapéutico o profiláctico deseados sin causar efectos tóxicos significativos o innecesarios. Para obtener o mantener la cantidad eficaz, el medicamento puede administrarse como una dosis única o en dosis múltiples. La cantidad eficaz puede variar aún más dependiendo de la severidad de la afección que debe tratarse o de la gravedad esperada de la afección que necesita prevenirse; esto puede depender del estado de salud general y físico del paciente y habitualmente se requerirá la evaluación del doctor o médico para establecer cuál es la cantidad eficaz. La cantidad eficaz puede además obtenerse por una combinación de diferentes tipos de administración. El medicamento puede administrarse como una solución (líquida o semilíquida, p. ej., tipo gel o en dispersión o suspensión, coloidal, en emulsión, suspensión de nanopartículas) o como un sólido (p. ej., comprimido, minicomprimido, cápsulas duras o blandas).

Para fines de la trombólisis, la dosificación de plasmina y la duración de la terapia con plasmina dependerán generalmente del tamaño y la ubicación del coágulo sanguíneo, así como del tamaño, peso y edad del paciente. Si un coágulo es venoso, el tratamiento con plasmina puede continuar durante días, mientras que solo pueden requerirse horas de terapia con plasmina si el coágulo es arterial. Un infarto de miocardio puede tratarse con un breve tratamiento de dosis única, mientras que las afecciones, tales como tromboflebitis y embolia pulmonar pueden requerir un tratamiento prolongado de múltiples dosis. La terapia trombólisis con plasmina prolongada continua y/o intermitente puede aplicarse para tratar una oclusión coronaria o en el caso de la terapia profiláctica con el fin de reducir el riesgo de formación de coágulos en los sujetos conocidos por presentar un mayor riesgo de desarrollar la

formación de coágulos. Un factor adicional que influye en la dosificación con plasmina incluye los niveles circulantes de los inhibidores de plasmina, tales como α 2-antiplasmina y/o α 2-macroglobulina, el nivel inicial de los que es dependiente del paciente. Puede ser aconsejable ajustar la dosificación de plasmina de modo que no más del 15 % de α 2-antiplasmina circulante total se mantiene con el fin de lograr la terapia trombolítica eficiente. Con el fin de inducir la trombólisis, poner en contacto un método de administración de plasmina o cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa a una distancia proximal corta en un trombo puede resultar ventajoso cuando se reduce la exposición a los inhibidores séricos. Dicho método de puesta en contacto consiste normalmente en la administración a través de un dispositivo de catéter. Para su uso en trombólisis, las dosificaciones típicas de plasmina oscilan entre 500 microgramos/peso corporal a 10 miligramos/peso corporal kg administradas como un bolo único o dividido en 1 inyección inicial en bolo seguido de 1 o más inyecciones repetidas en bolo. La plasmina, alternativamente, puede administrarse durante un periodo de tiempo prolongado, p. ej., mediante infusión o mediante microbomba para administración de fármacos. Las dosificaciones de plasmina para la administración continua pueden variar de 1 a 10 mg/kg/hora.

Una dosificación de plasmina típica para la inducción del desprendimiento vítreo posterior, licuefacción del vítreo, depuración de la sangre o hemorragias vítreas, o depuración de materiales tóxicos o sustancias extrañas de la cavidad vítrea pueden encontrarse en el intervalo de aproximadamente 0,1 microgramos a aproximadamente 250 microgramos por ojo por dosis, que pueden administrarse en un volumen diluyente o transportador de aproximadamente 50 microlitros y aproximadamente 300 microlitros por ojo por dosis. El diluyente o transportador puede ser, p. ej., una solución estéril salina equilibrada (SSE o SSE Plus), una solución salina fisiológica o una solución que contiene 1-10 mM de un ácido, tal como ácido cítrico. En una realización, la plasmina se administra al ojo en una dosis de 125 microgramos contenida en 0,1 ml de diluyente o transportador. En el caso de vitrectomía quirúrgica prevista, dicha plasmina puede administrarse al ojo 15 a 300 minutos, o 15 a 120 minutos antes de la vitrectomía. Alternativamente, el fin de administrar la plasmina en el ojo es evitar la vitrectomía quirúrgica, o facilitar la vitrectomía quirúrgica posterior en el caso de que el tratamiento con la propia plasmina no sea capaz de lograr el desprendimiento vítreo posterior completo. Al utilizar plasminógeno como una fuente alternativa para la plasmina (véase la definición de "plasmina"), hasta 250 microgramos de plasminógeno pueden introducirse por ojo y dicho plasminógeno puede ir acompañado de hasta 2.000 UI de uroquinasa o estreptoquinasa como activador del plasminógeno o hasta 25 microgramos de APt. Cuando se utiliza en el ojo, la administración de plasmina o plasminógeno puede acompañarse adicionalmente por la administración de un adyuvante gaseoso, tal como aire, un gas en expansión o gas licuable, o mezclas de los mismos, con tal de que no sea tóxico para el ojo. Otros materiales gaseosos adecuados incluyen SF6 (hexafluoruro de azufre) y perfluorocarbonos, tales como C2F6 (hexafluoroetano), C3F8 (octafluoropropano), C4F8 (octafluorociclobutano), oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, argón y otros gases inertes. El volumen del material gaseoso que se introduce en el ojo puede variar en función del material gaseoso, el paciente, y el resultado deseado. Por ejemplo, el volumen de aire que se inyecta en la cámara posterior puede variar de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 0,9 ml.

Otros materiales gaseosos, como SF6 y gases de perfluorocarbono pueden oscilar entre aproximadamente 0,3 ml a 0,5 ml. Preferentemente, el material gaseoso se introduce en la cámara posterior del ojo en una cantidad suficiente para comprimir el vítreo contra la hialoide posterior y formar una cavidad en el vítreo sin dañar el ojo. En realizaciones preferentes, el adyuvante gaseoso se introduce en el vítreo para formar una cavidad que se llena aproximadamente 40 % a aproximadamente 60 % del volumen interno de la cavidad intraocular.

Las dosificaciones citadas previamente son valores indicativos que no pretenden ser limitantes de manera alguna. Dichas dosificaciones se refieren además a plasmina o plasminógeno de tipo natural o cualquier variante truncada activa o activable de la misma. Cuando se utiliza una plasmina con el aumento de estabilidad según la invención (o cualquier variante o derivado de la misma o por lo tanto alternativa), y en función de la máxima estabilidad y la actividad residual de una plasmina de acuerdo con la invención, las dosis puede ser similar, mayor o menor para obtener el mismo o mejor efecto clínico global como se obtiene con plasmina de tipo natural. La dosificación de una plasmina según la invención puede también depender de la velocidad de inhibición por inhibidores endógenos, tales como α 2-antiplasmina.

En línea con el trabajo divulgado en el presente documento, la invención se refiere además a métodos para la exploración de variantes de plasmina autoproteolíticamente estable, dichos métodos comprenden las etapas de:

- (i) mutación de los aminoácidos glutamato en las posiciones 138 del dominio catalítico de plasmina humana, o del glutamato correspondiente de una plasmina no humana, en un aminoácido diferente del aminoácido natural en dicha posición 138;
- (ii) determinación de la estabilidad autoproteolítica del mutante obtenido a partir de (i), tal como se determina o analiza como se ha descrito previamente, p. ej. por medio de un ensayo de actividad de sustrato cromogénico o biológico; y
- (iii) selección a partir de (ii) de un mutante que es autoproteolíticamente estable como la variante de plasmina autoproteolíticamente estable;

en el que dicho dominio catalítico de plasmina humana comienza por el aminoácido valina en la posición 1, que es el mismo aminoácido valina que aparece en la posición 562 de Glu-plasminógeno humano.

En cualquiera de los métodos de exploración previos, dicho dominio catalítico puede comprender además una mutación de una lisina o arginina de tipo natural en un aminoácido no lisina, no arginina.

5 Los métodos de exploración previos pueden comprender además una etapa en la que se determina la actividad proteolítica de la variante de plasmina autoproteolíticamente estable.

10 Muchos productos, incluyendo medicamentos (en este caso para comprenderse específicamente como principio activo ya listo para el usuario, es decir, en la formulación final para la administración a un paciente) y los principios activos almacenados a granel de los medicamentos se almacenan por lo general durante un lapso de tiempo considerable antes de su uso. Es de interés extender la vida útil de los productos tanto como sea posible. Con la vida útil se entiende el tiempo durante el cual el producto puede utilizarse de forma segura y en el que el producto conserva su potente utilidad, es decir, su actividad en el caso de un medicamento y/o su principio activo. Normalmente, la vida útil se indica en un producto o su envase. Una vez que la vida útil ha expirado, la utilidad segura y potente de un producto ya no se garantiza. Otro aspecto importante adicional en productos de almacenamiento es la temperatura de almacenamiento a la que se puede lograr la vida útil deseada. Por ejemplo, la vida útil de un producto almacenado a +4 °C o temperatura media en el refrigerador puede ascender a 12 meses, mientras que la vida útil del mismo producto almacenado a -20 °C o temperatura media en el congelador puede ascender a 36 meses. Logísticamente, sin embargo, el mantenimiento de una cadena de frío a temperaturas de congelación, por ejemplo, -20 °C, es mucho más complejo, difícil y costoso de mantener que una cadena de frío a +4 °C. Por consiguiente, aún puede ser interesante poseer una vida útil más corta, pero suficientemente larga combinada con la posibilidad de almacenar un producto a +4 °C. La presente invención ofrece una solución para ampliar, mejorar o aumentar la vida útil o estabilidad de almacenamiento a largo plazo de la plasmina o cualquier fragmento activo o derivado del mismo o de una composición que comprende plasmina o cualquier derivado activo de la misma. La solución reside en la fabricación de variantes de plasmina disponibles como se describe en el presente documento, dichas variantes presentan una estabilidad mejorada, que, intrínsecamente, aumenta, mejora o extiende su vida útil.

30 La invención se refiere asimismo a métodos para mejorar la estabilidad de almacenamiento a largo plazo de una composición que comprende plasmina, comprendiendo dichos métodos la etapa de identificar una variante de plasmina autoproteolíticamente estable capaz de almacenarse durante un periodo prolongado sin pérdida significativa de la actividad proteolítica. Para determinar la estabilidad a largo plazo, una preparación de plasmina según la invención se alicuota y las medidas de actividad se llevan a cabo repetidamente durante el periodo de almacenamiento previsto. Si el periodo de almacenamiento previsto es, p. ej., 24 meses, las medidas de actividad pueden realizarse, p. ej., mensualmente. La pérdida permisible de la actividad proteolítica al final del periodo de almacenamiento previsto dependerá en gran medida de la aplicación clínica prevista pero generalmente puede no ser más de p. ej., 10 % a 15 %.

La invención se refiere además a métodos para producir una variante de plasminógeno según la invención.

40 Dichos métodos incluyen las etapas de:

- (i) introducir en una célula hospedadora adecuada un ácido nucleico codificante de una variante de plasminógeno según la invención en una célula hospedadora adecuada capaz de expresar dicho plasminógeno;
- (ii) cultivar la célula hospedadora obtenida en (i) en condiciones y durante un periodo suficiente para la expresión de dicho plasminógeno en dicha célula hospedadora; y
- (iii) recoger el plasminógeno expresado en (ii).

50 Finalmente, una etapa (iv) puede añadirse a dichos métodos que incluyen la purificación del plasminógeno recogido en (iii).

Las células hospedadoras adecuadas y métodos para la expresión y la producción se divulgan p. ej., en los documentos WO 90/13640 (células de insectos), WO 2002/050290 y WO 03/066842 (células de levadura), WO 2008/054592 (células bacterianas/proceso de replegado) y WO 2005/078109 (plantas transgénicas de lenteja de agua o células de plantas transgénicas).

55 La invención abarca además métodos para producir una variante de plasmina según el inventor.

60 Dichos métodos incluyen generalmente las etapas de producir un plasminógeno según la invención como se ha descrito previamente y comprenden además una etapa de activación del plasminógeno según la invención en una plasmina de acuerdo con la invención empleando un activador del plasminógeno adecuado (tal como APt, APu, uroquinasa, estreptoquinasa, estafiloquinasa o cualquier variante de la misma). Eventualmente una o más etapas pueden añadirse, en las que el plasminógeno se purifica antes de la activación, la plasmina activada se purifica y/o la plasmina activa se derivatiza como se ha descrito previamente y/o se inactiva de forma reversible y/o, opcionalmente, se llevan a cabo las condiciones de almacenamiento adecuadas (tales como solución estabilizante, liofilizada y/o baja temperatura).

65

En cualquiera de los métodos de producción previos, dicho dominio catalítico puede comprender además una mutación de una lisina o arginina de tipo natural en un aminoácido no lisina, no arginina.

5 Cualquiera de las variantes de plasminógeno, variantes de plasmina, o derivados de plasmina como se ha descrito previamente se obtienen preferentemente en forma libre, o soluble, p. ej., no unida o unida a la superficie del hospedador de expresión (como es el caso de la expresión en fagos).

10 La invención también se refiere a (una) secuencia(s) de ácido nucleico aislada(s) codificante(s) de una variante de plasminógeno o variante de plasmina según la invención. La invención también se refiere a (un) vector(es) recombinante(s) que comprende(n) dicho ácido nucleico. La invención también se refiere a (una) célula(s) hospedadoras transformada(s) con dicho ácido nucleico o con dicho vector recombinante.

Ejemplos

15 EJEMPLO 1. Construcción, expresión y purificación de variantes de plasminógeno y activación a plasmina

Vector de expresión

20 El vector de secreción pPICZαA adquirido en Invitrogen Corporation (Carlsbad, California) se utilizó para dirigir la expresión y la secreción de microplasminógeno humano recombinante en *Pichia pastoris*.

25 Este vector contiene la señal de secreción del prepro péptido del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*. Una secuencia de reconocimiento XhoI está presente en el extremo COOH-terminal de la señal de secreción del factor α, inmediatamente corriente arriba del sitio Lys-Arg que se escinde por Kex2 para eliminar la señal de secreción de la proteína madura. Este sitio de restricción XhoI puede utilizarse para clonar el gen de flujo de interés con el sitio de escisión Kex2 sintetizando el gen con los sitios de reconocimiento XhoI y Kex2 en su extremo 5'. El gen recombinante de interés se expresará a continuación con NH₂-terminal nativo. Desarrollado por ingeniería genética inmediatamente corriente abajo de la señal de secreción del factor α el vector pPICZαA es un sitio de clonación múltiple con sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI, Sfil, KpnI, SacII y XbaI que facilita la clonación de genes heterólogos.

Síntesis génica

35 Para mejorar la expresión de microplasminógeno humano en *Pichia pastoris*, los genes codificantes del microplasminógeno humano y variantes de los mismos se sintetizaron *de novo* teniendo en cuenta el uso del codón preferente por *Pichia pastoris*.

40 Para diseñar la secuencia génica optimizada por el codón, la secuencia de aminoácidos de microplasminógeno humano (SEQ ID NO: 19) se importó en el programa Gene Designer desarrollado por DNA2.0 (Menlo Park, California) y está disponible gratuitamente en internet. Esta secuencia se retrotraduce en la secuencia de ADN al emplear el codón estable de *Pichia pastoris* proporcionado por el programa. A continuación, la secuencia de nucleótidos se verificó manualmente y se ajustó para un mejor ajuste del uso del codón de *Escherichia coli*. Además, se eliminaron, cuando fue posible, secuencias palindrómicas de 6 pares de bases y repeticiones nucleótidas. En el extremo 5', se añadieron un sitio de restricción XhoI y el sitio de escisión Kex2 y en el extremo 3', se añadió un sitio de restricción XbaI. La secuencia resultante se divulga en la solicitud de patente internacional n.º PCT/EP2010/059902.

50 Con el fin de cambiar los residuos aminoácidos, las mutaciones se introdujeron mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II de Agilent (La Jolla, California) en la secuencia de microplasminógeno de tipo natural o en las secuencias de variante de microplasminógeno en las que los sitios de escisión autocatalítica específicos ya se modificaron (véase la solicitud de patente internacional n.º PCT/EP2010/059902). La cepa de *E. coli* TOP10 (Invitrogen) se transformó con la mezcla de mutagénesis dirigida al sitio y se seleccionaron los clones resistentes a ampicilina. La determinación de la secuencia de los clones de plásmido resultantes confirmó la mutagénesis precisa de la región de codificación de microplasminógeno diana, así como la ausencia de mutaciones no deseadas en la región de codificación.

Los siguientes cebadores se utilizaron para la mutagénesis dirigida al sitio:

Mutación Glu18Gln

60 GTTCGGTGCTGGTCTGTTGAAACAGGCACAATTACCTGTGATTG (sentido; SEQ ID NO: 20) y
CAATCACAGGTAATTGTGCCTTTCAACAGACCAGCACCGAAC (antisentido; SEQ ID NO: 21)

65 En una primera variante, el glutamato en la posición 138 se sustituye con una glutamina. Glu138 se codifica por el codón GAA en las posiciones 481-483. La nucleótidos GAA (posiciones 481-483) se convirtieron en CAG,

cambiando Glu138 a Gln en la proteína de microplasminógeno (la secuencia nucleótida se encuentra en SEQ ID NO: 22 y la secuencia aminoácida deducida en la SEC ID NO: 23).

5 En la segunda variante, el glutamato en la posición 138 se sustituye con una glutamina indicada en una variante de microplasminógeno en la que la lisina en la posición 147 ya se ha sustituido con glutamato (la secuencia nucleótida se encuentra en SEQ ID NO: 24 y la secuencia aminoácida deducida en la SEQ ID NO: 25).

10 En la tercera variante, el glutamato en la posición 138 se sustituye con una glutamina indicada en una variante de microplasminógeno en la que la lisina en la posición 147 ya se ha sustituido con histidina y la arginina en la posición 158 ya se ha sustituido con histidina (la secuencia nucleótida se encuentra en la SEQ ID NO: 26 y la secuencia aminoácida deducida en la SEC ID NO: 27).

Expresión de variantes de microplasminógeno y activación a plasmina

15 Antes de la activación, los mutantes de microplasminógeno se purificaron por inmunoafinidad directamente de los sobrenadantes de *Pichia pastoris*. Un anticuerpo de microplasmina anti-humano murino (ratones Balb/c criados utilizando microplasmina como antígeno; producido por la línea celular de hibridoma 5D10A4, disponible en ThromboGenics N.V.) se acopló en microesferas de sefarosa según el protocolo n.º 71500015AD de GE Healthcare. Siguiendo este protocolo, se prepararon 7,5 ml de resina de inmunoafinidad a partir de 45 mg de anticuerpo y se embalaron en una columna XK 16/20. El sobrenadante crudo de 200-400 ml (0,2 µ filtrado a partir del cultivo de *Pichia*/pH 6,0) se cargó directamente sobre la columna de afinidad 5D10A4. Tras una etapa de lavado (100 mM de KH₂P0₄, 0,5 M de NaCl, pH 6,2, 10 volúmenes de columna), la variante de microplasminógeno se eluyó con glicina-HCl 0,2 M, tampón pH 3,0, se neutralizó el eluato y se dializó contra un tampón fosfato de sodio de 25 mM, pH 7,2).

25 Las variantes de microplasmina se activaron esencialmente siguiendo el procedimiento como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 02/50290.

A modo de ejemplo, el microplasminógeno mutante E138Q descrito previamente y la correspondiente microplasmina activada se muestran en la Figura 3.

30 Las secuencias aminoácidas y secuencias nucleótidas de las especies de la variante de microplasminógeno y tipo natural se enumeran en lo sucesivo.

35 SEQ ID NO: 19 - secuencia aminoácida de microplasminógeno humano de tipo natural

APSFDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVAHPHSWPWQVSLRTRFGMHFCGGTLISPEWVLT
AAHCLEKSPRPSSYKVILGAHQEVNLEPHVQEIEVSRLFLEPTRKDIALLLKSSPAVITDK
VIPACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGTFGAGLLKEAQLPVIENKVCNRYEFLNGRV
QSTELCAGHLAGGTDSCQGDSGGPLVCFEKDKYILQGVTSWGLGCARPKNKPGVYVRVS
RFVTWIEGVMRNN

40 SEQ ID NO: 22 - variante de microplasminógeno con la sustitución Glu138Gln (codón mutado en negrita y cursiva subrayado, XhoI y XbaI subrayados)

CTCGAGAAAAGAGCACCTTCATTCGACTGTGGTAAGCCTCAGGTCGAACCTAAGAA
 GTGTCCAGGTCGTGTTGTCCGGTGGCTGTGTGGCTCATCCTCATTCTTGGCCTTGGCAA
 GTGTCTCTTAGAACTAGATTTGGTATGCACTTCTGTGGTGGCACCTTGATCTCACCTG
 AATGGGTCTTAACCGCAGCTCATTGTCTGGAGAAGTCACCACGTCATCTTCATACA
 AGGTCATCCTTGGCGCACATCAGGAAGTCAATCTTGAGCCTCATGTTTCAGGAGATCG
 AAGTCTCTCGTTTGTCTTGGAAACCAACTCGTAAAGACATTGCTCTTCTGAAGCTGTC
 ATCTCCTGCCGTGATTACCGACAAGGTAAATCCTGCCTGCTTGCCTAGTCCTAATTAC
 GTCGTTGCCGACCGTACCGAATGCTTCATTACTGGTTGGGGTGAGACTCAAGGTACG
 TTCGGTGCTGGTCTGTTGAAACAGGCACAATTACCTGTGATTGAGAAACAAGGTTTGT
 AACAGATACGAGTTCCTGAATGGTCGTGTTTCAGTCCACTGAGTTGTGTGCAGGTAC
 CTTGCAGGTGGTACTGATAGTTGTCAAGGTGATTCTGGTGGACCACTGGTGTGCTTC
 GAGAAGGATAAGTACATCTTACAAGGTGTTACGTCTTGGGGTCTTGGATGTGCTCGT
 CCTAACAAGCCAGGTGTCTACGTCAGAGTCTCCAGATTCGTAACCTTGGATCGAAGGT
 GTCATGCGTAACAACCTAATCTAGA

5 SEQ ID NO: 23 - secuencia aminoácida deducida de la SEQ ID NO: 22 (los aminoácidos N-terminales subrayados "LEKR" se codifican por los sitios de escisión XhoI + Kex2 introducidos; la mutación aminoácida introducida se indica en negrita/cursiva y se subraya)

LEKRAPSFD CGKPQVEPKKCPGRVVGGCV AHPHSWPWQVSLRTRFGMHFCGGTLISPE
 WVLTA AHCL EKSPRPSYK VILGAHQEVNLEPHVQEIEVSRLFLEPTRKDIAL LKLS SPA
 VITDKVIPACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGTFGAGLLKQAQLPV IENKVCNRYEFL
 NGRVQSTELCAGHLAGGTDSCQGD SGGPLVCFEKDKYILQGVTSWGLGCARP NKPGVY
 VRVSRFVTWIEGV MRNN

10 SEC ID NO: 24 - variante de microplasminógeno con las sustituciones Glu138Gln y Lys147Glu (codones mutados en negrita y cursiva subrayados, XhoI y XbaI subrayados)

CTCGAGAAAAGAGCACCTTCATTCGACTGTGGTAAGCCTCAGGTCGAACCTAAGAA
 GTGTCCAGGTCGTGTTGTCCGGTGGCTGTGTGGCTCATCCTCATTCTTGGCCTTGGCAA
 GTGTCTCTTAGAACTAGATTTGGTATGCACTTCTGTGGTGGCACCTTGATCTCACCTG

AATGGGTCTTAACCGCAGCTCATTGTCTGGAGAAGTCACCACGTCATCTTCATACA
 AGGTCATCCTTGGCGCACATCAGGAAGTCAATCTTGAGCCTCATGTTTCAGGAGATCG
 AAGTCTCTCGTTTGTCTTGGAAACCAACTCGTAAAGACATTGCTCTTCTGAAGCTGTC
 ATCTCCTGCCGTGATTACCGACAAGGTAATTCCTGCCTGCTTGCCTAGTCCTAATTAC
 GTCGTTGCCGACCGTACCGAATGCTTCATTA CTGGTTGGGGTGAGACTCAAGGTACG
 TTCGGTGCTGGTCTGTTGAAACCAGGCACAATTACCTGTGATTGAGAACGAAGTGTGT
 AACAGATACGAGTTCCTGAATGGTCGTGTT CAGTCCACTGAGTTGTGTGCAGGTAC
 ETTGCAGGTGGTACTGATAGTTGTCAAGGTGATTCTGGTGGACCACTGGTGTGCTTC
 GAGAAGGATAAGTACATCTTACAAGGTGTTACGTCTTGGGGTCTTGGATGTGCTCGT
 CCTAACAAGCCAGGTGTCTACGTCAGAGTCTCCAGATTCGTAACCTTGGATCGAAGGT
 GTCATGCGTAACAACTAATCTAGA

5 SEQ ID NO: 25 - secuencia aminoácida deducida de la SEQ ID NO: 24 (los aminoácidos N-terminales subrayados "LEKR" se codifican por los sitios de escisión XhoI + Kex2 introducidos; las mutaciones aminoácidas introducidas se indican en negrita y cursiva subrayadas)

LEKRAPSFDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCV AHPHSWPWQVSLRTRFGMHFCGGTLISPE
 WVLTAAHCLEKSPRPSSYK VILGAHQEVNLEPHVQEIEVSRLFLEPTRKDIALLLKLSSPA
 VIIDKVIPACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGTFGAGLLKQAQLPVIENEVCNRYEFL
 NGRVQSTELCAGHLAGGTDSCQGDSSGPLVCFEKDKYILQGVTSWGLGCARPKNKPGVY
 VRVSRFVTWIEGVMRNN

10 SEC ID NO: 26 - variante de microplasminógeno con las sustituciones Glu138Gln, Lys147His y Arg158His (codones mutados en negrita y cursiva subrayados, XhoI y XbaI subrayados)

CTCGAGAAAAAGAGCACCTTCATTGACTGTGGTAAGCCTCAGGTCGAACCTAAGAA
 GTGTCCAGGTCGIGTTGTCCGGTGGCTGTGIGGCTCATCCTCATTCTTGGCCTTGGCAA
 GTGTCTT TAGAACTAGATTTGGTATGCACTTCTGTGGTGGCACCTTGATCTCACCTG
 AATGGGTCTTAACCGCAGCTCATTGTCTGGAGAAGTCACCACGTCATCTTCATACA
 AGGTCATCCTTGGCGCACATCAGGAAGTCAATCTTGAGCCTCATGTTTCAGGAGATCG
 AAGTCTCTCGTTTGTCTTGGAAACCAACTCGTAAAGACATTGCTCTTCTGAAGCTGTC
 ATCTCCTGCCGTGATTACCGACAAGGTAATTCCTGCCTGCTTGCCTAGTCCTAATTAC
 GTCGTTGCCGACCGTACCGAATGCTTCATTA CTGGTTGGGGTGAGACTCAAGGTACG
 TTCGGTGCTGGTCTGTTGAAACCAGGCACAATTACCTGTGATTGAGAACCACGTGTGT

AACAGATACGAGTTCCTGAATGGAC***AC***CGTGCAGTCCACTGAGTTGTGTGCAGGTCAC
 CTTGCAGGTGGTACTGATAGTTGTCAAGGTGATTCTGGTGGACCACTGGTGTGCTTC
 GAGAAGGATAAGTACATCTTACAAGGTGTTACGTCTTGGGGTCTTGGATGTGCTCGT
 CCTAACAAGCCAGGTGTCTACGTCAGAGTCTCCAGATTCGTA***ACT***TGGATCGAAGGT
 GTCATGCGTAACA***ACT***AATCTAGA

SEQ ID NO: 27 - secuencia aminoácida deducida de la SEQ ID NO: 26 (los aminoácidos N-terminales subrayados "LEKR" se codifican por los sitios de escisión XhoI + Kex2 introducidos; las mutaciones aminoácidas introducidas se indican en negrita y cursiva subrayadas)

LEKRAPSFDCGK***PQ***VEPK***K***CPGRVVGCCVA***HP***HSWPWQ***V***SLRTRFG***M***HFCGGTLISPE
 WVLTAAHCLEKSPRPSSYK***V***ILGAHQEVNLEPHVQEIEVSR***L***FLEPTRKDIAL***L***KLSSPA
 VITDKVIPACLPSPNYV***V***ADRTECFITGWGETQGT***F***GAGLL***Q***AQLPV***IEN***HVCNRYEFL
 NG***H***VQSTELCAGHLAGGTDS***C***QGD***S***GGPL***V***CFEKDKYILQGVTSWGLG***C***ARP***N***KPGV
 YVRVSRFVTWIEGVMRNN

Constantes de velocidad de autólisis y parámetros cinéticos de variantes de microplasma

Los valores de la constante de la velocidad de autólisis y k_{cat}/K_m obtenidos para diversas mutantes de microplasma se enumeran en la Tabla 2 a continuación. Estos valores se obtuvieron esencialmente siguiendo los métodos descritos en los Ejemplos 3 y 4 de la solicitud de patente internacional n.º PCT/EP2010/059902.

Tabla 2.

Variante de microplasma	de	Parámetros cinéticos K_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	Constante k de velocidad de autólisis ($M^{-1}s^{-1}$)
Natural		$6,9 \times 10^5$	123
K147E		$8,5 \times 10^5$	24
E138Q		$9,5 \times 10^5$	4
E138Q K147E		$10,9 \times 10^5$	2
E138Q K147H R158H		$5,5 \times 10^5$	6

EJEMPLO 2. Eficacia terapéutica de las variantes de plasmina en modelos *in vitro* o *in vivo*.

2.1 Efecto de las variantes de plasmina en el tamaño del infarto cerebral.

La eficacia de las variantes de plasmina de la invención en la reducción del tamaño del infarto cerebral puede realizarse en un modelo de infarto cerebral murino como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 00/18436, o según Welsh *et al.* (1987, *J Neurochem* 49, 846-851). El efecto beneficioso de la plasmina de tipo natural en el tamaño del infarto cerebral se demostró en el Ejemplo 5 del documento WO 00/18436. Un experimento similar se lleva a cabo con cualquiera de las variantes de plasmina de la invención y el efecto beneficioso de estas variantes de plasmina se mide y se compara con el efecto beneficioso de la plasmina de tipo natural.

2.2 Actividad trombolítica *in vivo* de las variantes de plasmina

El modelo de trombólisis en el circuito extracorpóreo de conejo (Ejemplo 6 del documento WO 02/50290, Hotchkiss *et al.*, 1987, *Thromb Haemost* 58, 107 - *Reseña* 377), el modelo de trombosis inducido por bobina de cobre en la arteria coronaria circunfleja de perro (Ejemplo 8 del documento WO 02/50290; Bergmann *et al.*, 1983, *Science* 220, 1181-1183) o el modelo de trombosis en la vena yugular de conejo (Collen *et al.*, 1983, *J Clin Invest* 71, 368-376) se puede utilizar para demostrar la actividad trombolítica *in vivo* de las variantes de plasmina de la invención. El efecto beneficioso de la plasmina de tipo natural en la trombólisis se demostró con estos modelos como se describe en los Ejemplos 7 y 9 del documento WO 00/18436 por Collen *et al.* (1983). Experimentos similares se llevan a cabo con cualquiera de las variantes de plasmina de la invención y el efecto beneficioso de estas variantes de plasmina se mide y se compara con el efecto beneficioso de plasmina de tipo natural.

2.3 Actividad trombolítica *in vitro* de las variantes de plasmina

5 Un modelo *in vitro* de la oclusión arterial periférica (OAP) se describe en el Ejemplo 6 del documento WO 01/36609 y la eficacia trombolítica de la plasmina de tipo natural se demostró en este modelo. Un experimento similar se lleva a cabo con cualquiera de las variantes de plasmina de la invención y el efecto beneficioso de estas variantes de plasmina sobre la trombólisis de las oclusiones arteriales periféricas se mide y se compara con el efecto beneficioso de la plasmina de tipo natural.

2.4 Licuefacción del ojo vítreo y desprendimiento vítreo posterior inducidos por variantes de plasmina

10 El Ejemplo 5 del documento WO 2004/052228 divulga un ensayo para determinar la eficacia, así como la eficacia de la microplasmina en la licuefacción del vítreo en los ojos de cerdos post-mortem. El Ejemplo 6 del documento WO 2004/052228 divulga un ensayo para determinar la eficacia, así como la eficacia de la microplasmina en la inducción del desprendimiento vítreo posterior (DVP) en los ojos post-mortem humanos. La inducción de la licuefacción del vítreo y DVP por las variantes de plasmina de la invención se demuestra en modelos post-mortem similares.

2.5 DVP *in vivo* inducido por las variantes de plasmina

20 El Ejemplo 7 del documento WO 2004/052228 divulga un ensayo para determinar la eficacia, así como la eficacia de la microplasmina en la inducción del DVP en un modelo felino *in vivo*. La inducción del DVP por las variantes de plasmina de la invención se demuestra en un modelo similar *in vivo*.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> ThromboGenics N.V.

<120> Variantes de plasminógeno y plasmina

30 <130> TG-041

<150> EP 11 150 246

<151> 05-01-2011

35 <150> US 61/429.868

<151> 05-01-2011

<160> 27

40 <170> Patent In versión 3.5

<210> 1

<211> 791

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 583 082 T3

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
 Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe Gln Tyr His
 35 40 45
 Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg Lys Ser Ser
 50 55 60
 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
 Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser
 100 105 110
 Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu
 115 120 125
 Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp
 130 135 140
 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

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

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

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

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

Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys
 245 250 255

Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr Val
 260 265 270

Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His
 275 280 285

Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr
 290 295 300

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

Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu Leu Thr
 340 345 350

Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly
 355 360 365

Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser
 370 375 380

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		
Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro	Ser	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Asn	Leu	
			420					425					430			
Lys	Lys	Cys	Ser	Gly	Thr	Glu	Ala	Ser	Val	Val	Ala	Pro	Pro	Pro	Val	
		435					440					445				
Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Val	Glu	Thr	Pro	Ser	Glu	Glu	Asp	Cys	Met	Phe	
	450					455					460					
Gly	Asn	Gly	Lys	Gly	Tyr	Arg	Gly	Lys	Arg	Ala	Thr	Thr	Val	Thr	Gly	
465					470					475					480	
Thr	Pro	Cys	Gln	Asp	Trp	Ala	Ala	Gln	Glu	Pro	His	Arg	His	Ser	Ile	
				485					490					495		
Phe	Thr	Pro	Glu	Thr	Asn	Pro	Arg	Ala	Gly	Leu	Glu	Lys	Asn	Tyr	Cys	
			500					505					510			
Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Val	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asn	
		515					520					525				
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	
Arg	Val	Val	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	His	Pro	His	Ser	Trp	Pro	Trp	Gln	
			565						570					575		
Val	Ser	Leu	Arg	Thr	Arg	Phe	Gly	Met	His	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	
			580					585					590			
Ile	Ser	Pro	Glu	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Glu	Lys	Ser	
		595					600					605				
Pro	Arg	Pro	Ser	Ser	Tyr	Lys	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	His	Gln	Glu	Val	
	610					615					620					
Asn	Leu	Glu	Pro	His	Val	Gln	Glu	Ile	Glu	Val	Ser	Arg	Leu	Phe	Leu	
625					630					635					640	
Glu	Pro	Thr	Arg	Lys	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Pro	Ala	
				645					650					655		

Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr
 660 665 670

Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr
 675 680 685

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 812
 5 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 <400> 2

Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
 1 5 10 15

Gly His Gly Ser Leu Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser
 20 25 30

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

Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Glu Thr Gly Phe Ile Cys Arg Ser Phe
 50 55 60

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Pro Glu Asn Ser
 65 70 75 80

Lys Ser Ser Ile Val Phe Arg Met Arg Asp Val Phe Leu Phe Glu Lys
 85 90 95
 Arg Ile Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Thr Tyr Arg
 100 105 110
 Gly Thr Met Ala Lys Thr Lys Asn Asp Val Ala Cys Gln Lys Trp Ser
 115 120 125
 Asp Asn Ser Pro His Lys Pro Asn Tyr Thr Pro Glu Lys His Pro Leu
 130 135 140
 Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Asn
 145 150 155 160
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Asp Val Arg Phe Asp Tyr Cys
 165 170 175
 Asn Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
 180 185 190
 Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Lys Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
 195 200 205
 Trp Asn Ser Gln Thr Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
 210 215 220
 Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu
 225 230 235 240
 Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Met Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Phe
 245 250 255
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser Gly Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Lys Val Ser
 275 280 285
 Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Glu Gln Thr Pro
 290 295 300
 His Lys His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
 305 310 315 320
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr
 325 330 335

Thr Thr Asn Ser Glu Val Arg Trp Glu His Cys Gln Ile Pro Ser Cys
 340 345 350
 Glu Ser Ser Pro Ile Thr Thr Glu Tyr Leu Asp Ala Pro Ala Ser Val
 355 360 365
 Pro Pro Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly
 370 375 380
 Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Arg Lys Cys
 385 390 395 400
 Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Glu Lys Thr Pro Glu
 405 410 415
 His Phe Pro Glu Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp
 420 425 430
 Ala Asp Lys Ser Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp
 435 440 445
 Glu Phe Cys Asn Leu Arg Lys Cys Leu Asp Pro Glu Ala Ser Ala Thr
 450 455 460
 Asn Ser Pro Ala Val Pro Gln Val Pro Ser Gly Gln Glu Pro Ser Ala
 465 470 475 480
 Ser Asp Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Lys Ala
 485 490 495
 Thr Thr Val Met Gly Ile Pro Cys Gln Glu Trp Ala Ala Gln Glu Pro
 500 505 510
 His Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Gln Ala Gly Leu
 515 520 525
 Glu Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro Trp
 530 535 540
 Cys Tyr Thr Met Asn Gln Arg Lys Leu Phe Asp Tyr Cys Asp Val Pro
 545 550 555 560
 Gln Cys Val Ser Thr Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro
 565 570 575
 Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala Asn Pro His
 580 585 590

Ser Trp Pro Trp Gln Ile Ser Leu Arg Thr Arg Tyr Gly Lys His Phe
 595 600 605

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

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

Ala His Lys Glu Val Asn Leu Glu Ser Asp Val Gln Glu Ile Glu Val
 645 650 655

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

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

Pro Pro Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Leu Cys Tyr Ile Thr
 690 695 700

Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu
 705 710 715 720

Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Tyr
 725 730 735

Leu Asn Gly Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly Asn Leu Ala
 740 745 750

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

Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu
 770 775 780

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

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

<210> 3
 <211> 810
 <212> PRT
 <213> *Pan troglodytes*

5

<400> 3

Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser
 20 25 30
 Leu Phe Ser Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu
 35 40 45
 Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Lys Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe
 50 55 60
 Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg
 65 70 75 80
 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
 Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser
 115 120 125
 Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser
 130 135 140
 Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln
 145 150 155 160
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
 165 170 175
 Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
 180 185 190
 Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
 195 200 205
 Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
 210 215 220
 Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu
 225 230 235 240
 Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu

				245					250					255		
Cys	Asp	Ile	Pro	Arg	Cys	Thr	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Thr	
			260					265					270			
Tyr	Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	Thr	Gly	Glu	Asn	Tyr	Arg	Gly	Asn	Val	Ala	
		275					280					285				
Val	Thr	Val	Ser	Gly	His	Thr	Cys	Gln	His	Trp	Ser	Ala	Gln	Thr	Pro	
	290					295					300					
His	Thr	His	Asn	Arg	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Pro	Cys	Lys	Asn	Leu	Asp	
305					310					315					320	
Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	Ala	Pro	Trp	Cys	His	
				325					330					335		
Thr	Thr	Asn	Ser	Gln	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Lys	Ile	Pro	Ser	Cys	
			340					345					350			
Asp	Ser	Ser	Leu	Val	Ser	Thr	Glu	Gln	Leu	Ala	Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	
		355					360					365				
Glu	Leu	Thr	Pro	Val	Val	Gln	Asp	Cys	Tyr	His	Gly	Asp	Gly	Gln	Ser	
	370					375					380					
Tyr	Arg	Gly	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Lys	Cys	Gln	Ser	
385					390					395					400	
Trp	Ser	Ser	Met	Thr	Pro	His	Arg	His	Gln	Lys	Thr	Pro	Glu	Asn	Tyr	
				405					410					415		
Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	Thr	Met	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Asp	
			420					425					430			
Lys	Gly	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro	Ser	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	
		435					440					445				
Cys	Asn	Leu	Lys	Lys	Cys	Ser	Gly	Thr	Glu	Ala	Ser	Val	Val	Ala	Pro	
	450					455					460					
Pro	Pro	Val	Val	Gln	Leu	Pro	Asn	Val	Glu	Thr	Pro	Ser	Glu	Glu	Asp	
465					470					475					480	
Cys	Met	Phe	Gly	Asn	Gly	Lys	Gly	Tyr	Arg	Gly	Lys	Arg	Ala	Thr	Thr	
				485					490					495		

Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 500 505 510
 His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
 515 520 525
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
 530 535 540
 Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
 545 550 555 560
 Ala Ser 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
 Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Leu Gly Met His Phe Cys Gly
 595 600 605
 Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu
 610 615 620
 Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His
 625 630 635 640
 Gln Glu Val Lys Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg
 645 650 655
 Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Thr Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser
 660 665 670
 Ser Pro Ala Ile Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser
 675 680 685
 Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp
 690 695 700
 Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln
 705 710 715 720
 Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Asn Glu Phe Leu Asn
 725 730 735
 Gly Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly
 740 745 750

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

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

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> 4
 <211> 815
 <212> PRT
 <213> *Pan troglodytes*

5

<400> 4

Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
 1 5 10 15

Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser
 20 25 30

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

Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Lys Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe
 50 55 60

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg
 65 70 75 80

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

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

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

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

10

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
 165 170 175
 Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
 180 185 190
 Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
 195 200 205
 Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
 210 215 220
 Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu
 225 230 235 240
 Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu
 245 250 255
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
 275 280 285
 Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro
 290 295 300
 His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
 305 310 315 320
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His
 325 330 335
 Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 340 345 350
 Asp Ser Ser Leu Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro
 355 360 365
 Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
 370 375 380
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
 385 390 395 400
 Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr
 405 410 415

Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp
420 425 430

Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
435 440 445

Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro
450 455 460

Pro Pro Val Val Gln Leu Pro Asn Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp
465 470 475 480

Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
485 490 495

Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
500 505 510

His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
515 520 525

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
530 535 540

Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
545 550 555 560

Ala Ser 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

Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Ser Ser Asn Ile Ala Gly Lys Tyr
595 600 605

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

Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val
625 630 635 640

Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val Lys Leu Glu Pro His Val Gln Glu
645 650 655

Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Thr Asp Ile Ala

660 665 670
 Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Ile Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro
 675 680 685
 Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys
 690 695 700
 Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu
 705 710 715 720
 Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg
 725 730 735
 Asn Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly
 740 745 750
 His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 755 760 765
 Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser
 770 775 780
 Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg
 785 790 795 800
 Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 805 810 815

<210> 5
 <211> 800
 <212> PRT
 <213> *Pan troglodytes*

5

<400> 5

Met Leu Met Asp Tyr Glu Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val
 1 5 10 15
 Asn Thr Gln Gly Ala Ser Leu Phe Ser Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly
 20 25 30
 Ala Gly Ser Ile Glu Glu Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Lys Glu
 35 40 45
 Phe Thr Cys Arg Ala Phe Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val
 50 55 60
 Ile Met Ala Glu Asn Arg Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp

10

ES 2 583 082 T3

65					70					75					80
Val	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Val	Tyr	Leu	Ser	Glu	Cys	Lys	Thr	Gly
				85					90					95	
Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Arg	Gly	Thr	Met	Ser	Lys	Thr	Lys	Asn	Gly	Ile
			100					105					110		
Thr	Cys	Gln	Lys	Trp	Ser	Ser	Thr	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Arg	Phe	Ser
		115					120					125			
Pro	Ala	Thr	His	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Glu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn
	130					135					140				
Pro	Asp	Asn	Asp	Pro	Gln	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu
145					150					155					160
Lys	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Asp	Ile	Leu	Glu	Cys	Glu	Glu	Glu	Cys	Met
				165					170					175	
His	Cys	Ser	Gly	Glu	Asn	Tyr	Asp	Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Thr	Met	Ser
			180					185					190		
Gly	Leu	Glu	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Ala	His	Gly
		195					200					205			
Tyr	Ile	Pro	Ser	Lys	Phe	Pro	Asn	Lys	Asn	Leu	Lys	Lys	Asn	Tyr	Cys
	210					215					220				
Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Leu	Arg	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro
225					230					235					240
Asn	Lys	Arg	Trp	Glu	Leu	Cys	Asp	Ile	Pro	Arg	Cys	Thr	Thr	Pro	Pro
				245					250					255	
Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Thr	Tyr	Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	Thr	Gly	Glu	Asn
			260					265					270		
Tyr	Arg	Gly	Asn	Val	Ala	Val	Thr	Val	Ser	Gly	His	Thr	Cys	Gln	His
		275					280					285			
Trp	Ser	Ala	Gln	Thr	Pro	His	Thr	His	Asn	Arg	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe
	290					295					300				
Pro	Cys	Lys	Asn	Leu	Asp	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Lys
305					310					315					320

Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr
 325 330 335
 Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp Ser Ser Leu Val Ser Thr Glu Gln Leu
 340 345 350
 Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr
 355 360 365
 His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr
 370 375 380
 Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln
 385 390 395 400
 Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys
 405 410 415
 Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro
 420 425 430
 Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu
 435 440 445
 Ala Ser Val Val Ala Pro Pro Pro Val Val Gln Leu Pro Asn Val Glu
 450 455 460
 Thr Pro Ser Glu Glu Asp Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg
 465 470 475 480
 Gly Lys Arg Ala Thr Thr Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala
 485 490 495
 Ala Gln Glu Pro His Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro
 500 505 510
 Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val
 515 520 525
 Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr
 530 535 540
 Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala Ser Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro
 545 550 555 560
 Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val
 565 570 575

Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Leu
 580 585 590

Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu
 595 600 605

Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys
 610 615 620

Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val Lys Leu Glu Pro His Val Gln
 625 630 635 640

Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Thr Asp Ile
 645 650 655

Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Ile Ile Thr Asp Lys Val Ile
 660 665 670

Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu
 675 680 685

Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly
 690 695 700

Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn
 705 710 715 720

Arg Asn Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala
 725 730 735

Gly His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly
 740 745 750

Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr
 755 760 765

Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val
 770 775 780

Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 785 790 795 800

<210> 6
 <211> 810
 5 <212> PRT
 <213> *Macaca mulatta*
 <400> 6

ES 2 583 082 T3

Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
1 5 10 15

Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Lys Gly Ala Ser
20 25 30

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

Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Glu Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ser Phe
50 55 60

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg
65 70 75 80

Lys Ser Ser Ile Val Phe 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asp Val Ala
 275 280 285
 Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys His Gly Trp Ser Ala Gln Thr Pro
 290 295 300
 His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
 305 310 315 320
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr
 325 330 335
 Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 340 345 350
 Glu Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Pro Leu Asp Pro Thr Ala Pro Pro
 355 360 365
 Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
 370 375 380
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
 385 390 395 400
 Trp Ser Ser Met Thr Pro His Trp His Glu Lys Thr Pro Glu Asn Phe
 405 410 415
 Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp
 420 425 430
 Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 435 440 445
 Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Gly Ser Val Ala Ala Pro
 450 455 460
 Pro Pro Val Ala Gln Leu Pro Asp Ala Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 465 470 475 480
 Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Lys Ala Thr Thr
 485 490 495
 Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Glu Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Ser

500					505					510					
His	Arg	Ile	Phe	Thr	Pro	Glu	Thr	Asn	Pro	Arg	Ala	Gly	Leu	Glu	Lys
		515					520					525			
Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Val	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr
	530					535					540				
Thr	Thr	Asn	Pro	Arg	Lys	Leu	Phe	Asp	Tyr	Cys	Asp	Val	Pro	Gln	Cys
545					550					555					560
Ala	Ala	Ser	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	Tyr	Pro	His	Ser	Trp
			580					585					590		
Pro	Trp	Gln	Ile	Ser	Leu	Arg	Thr	Arg	Leu	Gly	Met	His	Phe	Cys	Gly
		595					600					605			
Gly	Thr	Leu	Ile	Ser	Pro	Glu	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu
	610					615					620				
Glu	Lys	Ser	Ser	Arg	Pro	Ser	Phe	Tyr	Lys	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	His
625					630					635					640
Arg	Glu	Val	His	Leu	Glu	Pro	His	Val	Gln	Glu	Ile	Glu	Val	Ser	Lys
				645					650					655	
Met	Phe	Ser	Glu	Pro	Ala	Arg	Ala	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Lys	Leu	Ser
			660					665					670		
Ser	Pro	Ala	Ile	Ile	Thr	Asp	Lys	Val	Ile	Pro	Ala	Cys	Leu	Pro	Ser
		675					680					685			
Pro	Asn	Tyr	Val	Val	Ala	Asp	Arg	Thr	Glu	Cys	Phe	Ile	Thr	Gly	Trp
	690					695					700				
Gly	Glu	Thr	Gln	Gly	Thr	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	Arg
705					710					715					720
Leu	Pro	Val	Ile	Glu	Asn	Lys	Val	Cys	Asn	Arg	Tyr	Glu	Phe	Leu	Asn
				725					730					735	
Gly	Thr	Val	Lys	Thr	Thr	Glu	Leu	Cys	Ala	Gly	His	Leu	Ala	Gly	Gly
			740					745					750		

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

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

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> 7

<211> 810

5 <212> PRT

<213> *Pongo abelii*

<400> 7

Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
1 5 10 15

Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser
20 25 30

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

Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Glu Lys Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe
50 55 60

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg
65 70 75 80

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

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

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

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

10

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu His Arg Tyr Asp Tyr Cys
 165 170 175
 Asp Ile Pro Glu Cys Glu Glu Ala Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
 180 185 190
 Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
 195 200 205
 Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
 210 215 220
 Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu
 225 230 235 240
 Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu
 245 250 255
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
 275 280 285
 Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln Arg Trp Ser Ala Gln Thr Pro
 290 295 300
 Gln Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
 305 310 315 320
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr
 325 330 335
 Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 340 345 350
 Gly Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Asp Pro Thr Ala Pro Pro
 355 360 365
 Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
 370 375 380
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
 385 390 395 400
 Trp Ser Ser Met Thr Pro His Trp His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr
 405 410 415

Pro Asp Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp
 420 425 430

Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 435 440 445

Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Gly Ser Val Val Ala Pro
 450 455 460

Pro Pro Val Val Gln Leu Pro Asn Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 465 470 475 480

Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
 485 490 495

Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Glu Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 500 505 510

His Ser Ile Phe Thr Pro Gln Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
 515 520 525

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Glu Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
 530 535 540

Thr Thr Asn Pro Arg Lys His Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
 545 550 555 560

Ala Ser Ser 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 Asn Ala His Ser Trp
 580 585 590

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

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

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

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

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

ES 2 583 082 T3

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

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

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

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

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

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

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

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> 8
 <211> 809
 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

5

<400> 8

Met Asp His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Asp Ser Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Phe
 20 25 30

Leu Phe Ser Leu Ser Arg Lys Gln Val Ala Ala Arg Ser Val Glu Glu
 35 40 45

Cys Ala Ala Lys Cys Glu Ala Glu Thr Asn Phe Ile Cys Arg Ala Phe
 50 55 60

Gln Tyr His Ser Lys Asp Gln Gln Cys Val Val Met Ala Glu Asn Ser
 65 70 75 80

10

Lys Thr Ser Pro Ile Ala Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys
 85 90 95
 Arg Ile Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg
 100 105 110
 Gly Thr Thr Ser Lys Thr Lys Ser Gly Val Ile Cys Gln Lys Trp Ser
 115 120 125
 Val Ser Ser Pro His Ile Pro Lys Tyr Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu
 130 135 140
 Ala Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Lys
 145 150 155 160
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Thr Arg Phe Asp Tyr Cys
 165 170 175
 Asp Ile Pro Glu Cys Glu Asp Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu His
 180 185 190
 Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Ile Glu Cys Gln Ser
 195 200 205
 Trp Gly Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Leu Pro Ser Lys Phe
 210 215 220
 Pro Asn Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu
 225 230 235 240
 Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Phe
 245 250 255
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Thr Ser Gly Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser
 275 280 285
 Val Thr Ala Ser Gly His Thr Cys Gln Arg Trp Ser Ala Gln Ser Pro
 290 295 300
 His Lys His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu
 305 310 315 320
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr

				325						330						335
Thr	Thr	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Trp	Asp	Tyr	Cys	Lys	Ile	Pro	Ser	Cys	
			340					345					350			
Gly	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	Tyr	Leu	Asp	Ala	Pro	Val	Pro	Pro	
		355					360					365				
Glu	Gln	Thr	Pro	Val	Ala	Gln	Asp	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Glu	Ser	
	370					375					380					
Tyr	Arg	Gly	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Ile	Thr	Gly	Arg	Lys	Cys	Gln	Ser	
385					390					395				400		
Trp	Val	Ser	Met	Thr	Pro	His	Arg	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Gly	Asn	Phe	
				405					410					415		
Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	Thr	Met	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Asp	
			420					425					430			
Lys	Ser	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Arg	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	
		435					440					445				
Cys	Asn	Leu	Lys	Lys	Cys	Ser	Glu	Thr	Glu	Gln	Gln	Val	Thr	Asn	Phe	
	450					455					460					
Pro	Ala	Ile	Ala	Gln	Val	Pro	Ser	Val	Glu	Asp	Leu	Ser	Glu	Asp	Cys	
465					470					475					480	
Met	Phe	Gly	Asn	Gly	Lys	Arg	Tyr	Arg	Gly	Lys	Arg	Ala	Thr	Thr	Val	
				485					490					495		
Ala	Gly	Val	Pro	Cys	Gln	Glu	Trp	Ala	Ala	Gln	Glu	Pro	His	Arg	His	
			500					505					510			
Ser	Ile	Phe	Thr	Pro	Glu	Thr	Asn	Pro	Arg	Ala	Gly	Leu	Glu	Lys	Asn	
		515					520					525				
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Asp	Asn	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	
	530					535					540					
Thr	Asn	Pro	Gln	Lys	Leu	Phe	Asp	Tyr	Cys	Asp	Val	Pro	Gln	Cys	Val	
545					550					555					560	
Thr	Ser	Ser	Phe	Asp	Cys	Gly	Lys	Pro	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Lys	Cys	
				565					570					575		

ES 2 583 082 T3

Pro Ala Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ser Ile Pro His Ser Trp Pro
580 585 590

Trp Gln Ile Ser Leu Arg His Arg Tyr Gly Gly His Phe Cys Gly Gly
595 600 605

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

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

Glu Tyr His Leu Gly Glu Gly Val Gln Glu Ile Asp Val Ser Lys Leu
645 650 655

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

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

Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Ala Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly
690 695 700

Glu Thr Lys Gly Thr Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Arg Leu
705 710 715 720

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

Lys Val Ser Pro Asn Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Ile
740 745 750

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

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

Leu Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr
785 790 795 800

Trp Ile Glu Glu Ile Met Arg Arg Asn
805

<210> 9
<211> 812
<212> PRT
5 <213> *Bos Taurus*

<400> 9

Met Leu Pro Ala Ser Pro Lys Met Glu His Lys Ala Val Val Phe Leu
 1 5 10 15
 Ile Leu Leu Phe Leu Lys Ser Gly Leu Gly Asp Leu Leu Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser Leu Leu Ser Leu Ser Arg Lys Asn Leu
 35 40 45
 Ala Gly Arg Ser Val Glu Asp Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Glu Thr
 50 55 60
 Asp Phe Val Cys Arg Ala Phe Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys
 65 70 75 80
 Val Val Met Ala Glu Asn Ser Lys Asn Thr Pro Val Phe Arg Met Arg
 85 90 95
 Asp Val Ile Leu Tyr Glu Lys Arg Ile Tyr Leu Leu Glu Cys Lys Thr
 100 105 110
 Gly Asn Gly Gln Thr Tyr Arg Gly Thr Thr Ala Glu Thr Lys Ser Gly
 115 120 125
 Val Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ala Thr Ser Pro His Val Pro Lys Phe
 130 135 140
 Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg
 145 150 155 160
 Asn Pro Asp Asn Asp Glu Asn Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro
 165 170 175
 Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Glu Cys Glu Asp Lys Cys
 180 185 190
 Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Glu Gly Lys Ile Ala Lys Thr Met
 195 200 205
 Ser Gly Arg Asp Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His
 210 215 220
 Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr
 225 230 235 240

Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp
 245 250 255
 Pro Gln Lys Arg Trp Glu Phe Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro
 260 265 270
 Pro Pro Ser Ser Gly Pro Lys Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Lys
 275 280 285
 Asn Tyr Gly Gly Thr Val Ala Val Thr Glu Ser Gly His Thr Cys Gln
 290 295 300
 Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His Lys His Asn Arg Thr Pro Glu Asn
 305 310 315 320
 Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asn Gly
 325 330 335
 Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Ser Lys Val Arg Trp Glu
 340 345 350
 Tyr Cys Thr Ile Pro Ser Cys Glu Ser Ser Pro Leu Ser Thr Glu Arg
 355 360 365
 Met Asp Val Pro Val Pro Pro Glu Gln Thr Pro Val Pro Gln Asp Cys
 370 375 380
 Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile
 385 390 395 400
 Thr Gly Arg Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His
 405 410 415
 Leu Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr
 420 425 430
 Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Ser Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp
 435 440 445
 Pro Arg Val Arg Trp Glu Phe Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Glu Thr
 450 455 460
 Pro Glu Gln Val Pro Ala Ala Pro Gln Ala Pro Gly Val Glu Asn Pro
 465 470 475 480
 Pro Glu Ala Asp Cys Met Ile Gly Met Gly Lys Ser Tyr Arg Gly Lys
 485 490 495

Lys Ala Thr Thr Val Ala Gly Val Pro Cys Gln Glu Trp Ala Ala Gln
 500 505 510

Glu Pro His His His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Gln Ser
 515 520 525

Gly Leu Glu Arg Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly
 530 535 540

Pro Trp Cys Tyr Thr Met Asn Pro Arg Lys Leu Phe Asp Tyr Cys Asp
 545 550 555 560

Val Pro Gln Cys Glu Ser Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Lys Val Glu
 565 570 575

Pro Lys Lys Cys Ser Gly Arg Ile Val Gly Gly Cys Val Ser Lys Pro
 580 585 590

His Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Arg Ser Ser Arg His Phe
 595 600 605

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

Cys Leu Asp Asn Ile Leu Ala Leu Ser Phe Tyr Lys Val Ile Leu Gly
 625 630 635 640

Ala His Asn Glu Lys Val Arg Glu Gln Ser Val Gln Glu Ile Pro Val
 645 650 655

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

Leu Ser Arg Pro Ala Ile Ile Thr Lys Glu Val Ile Pro Ala Cys Leu
 675 680 685

Pro Pro Pro Asn Tyr Met Val Ala Ala Arg Thr Glu Cys Tyr Ile Thr
 690 695 700

Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Glu Gly Leu Leu Lys Glu
 705 710 715 720

Ala His Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Asn Glu Tyr
 725 730 735

Leu Asp Gly Arg Val Lys Pro Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ile

740 745 750

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

Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu
770 775 780

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

Tyr Val Pro Trp Ile Glu Glu Thr Met Arg Arg Asn
805 810

5 <210> 10
 <211> 811
 <212> PRT
 <213> *Equus caballus*
 <400> 10

Met Glu His Gln Glu Val Val Phe Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
1 5 10 15

Gly His Gly Asp Ile Leu Asp Asp Tyr Val Thr Thr Gln Gly Ala Ser
20 25 30

Leu Phe Thr Phe Thr Arg Lys Pro Leu Ser Ala Ser Ser Ile Glu Glu
35 40 45

Cys Glu Ala Lys Cys Thr Glu Glu Thr Ala Phe Ile Cys Arg Ala Phe
50 55 60

Gln Tyr His Ser Lys Glu Pro Arg Cys Val Leu Leu Ala Glu Asn Arg
65 70 75 80

Lys Ser Ser Pro Val Met Arg Met Arg Asp Val Ile Leu Phe Glu Lys
85 90 95

Arg Ile Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Thr Gly Arg Ser Tyr Arg
100 105 110

Gly Thr Thr Ser Lys Thr Lys Asn Gly Val Ser Cys Gln Lys Trp Ser
115 120 125

Asp Thr Ser Pro His Ile Pro Lys Tyr Ser Pro Asp Lys Asn Pro Ser
130 135 140

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Lys

145					150						155				160
Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Gly	Thr	Arg	Phe	Asp	Tyr	Cys
				165					170					175	
Asp	Ile	Pro	Glu	Cys	Glu	Asp	Glu	Cys	Met	His	Cys	Ser	Gly	Glu	Asn
			180					185					190		
Tyr	Glu	Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Glu	Cys	Gln	Pro
		195					200					205			
Trp	Ala	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Ala	His	Gly	Tyr	Ile	Pro	Ser	Lys	Phe
	210					215					220				
Pro	Asn	Lys	Asn	Leu	Arg	Met	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu
225					230					235					240
Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Met	Asp	Pro	Asp	Lys	Arg	Trp	Glu	Phe
				245					250					255	
Cys	Asp	Ile	Pro	Arg	Cys	Ser	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Thr
			260					265					270		
Tyr	Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	Arg	Gly	Glu	Asn	Tyr	Arg	Gly	Arg	Val	Ser
		275					280					285			
Val	Thr	Gln	Ser	Gly	Leu	Thr	Cys	Gln	Arg	Trp	Ser	Glu	Gln	Thr	Pro
	290					295					300				
His	Lys	His	Asn	Arg	Thr	Pro	Asp	Asn	Phe	Pro	Cys	Lys	Asn	Leu	Asp
305					310					315					320
Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Thr	Ala	Pro	Trp	Cys	Tyr
				325					330					335	
Thr	Thr	Ser	Ser	Glu	Thr	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Asn	Ile	Pro	Ser	Cys
			340					345					350		
Thr	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Thr	Glu	Ile	Thr	Asp	Ala	Ser	Glu	Pro	Pro
		355					360					365			
Glu	Gln	Thr	Pro	Val	Val	Gln	Asp	Cys	Tyr	Gln	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser
	370					375					380				
Tyr	Arg	Gly	Thr	Ser	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Gly	Lys	Lys	Cys	Gln	Ser
385					390					395					400

Trp Ser Ser Met Thr Pro His Trp His Gln Lys Thr Pro Glu Lys Tyr
 405 410 415
 Pro Asn Ala Asp Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp
 420 425 430
 Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Phe
 435 440 445
 Cys Asn Leu Arg Arg Cys Ser Glu Thr Gln Gln Ser Phe Ser Asn Ser
 450 455 460
 Ser Pro Thr Asp Thr Gln Val Pro Ser Val Gln Glu Pro Ser Glu Pro
 465 470 475 480
 Asp Cys Met Leu Gly Ile Gly Lys Gly Tyr Gln Gly Lys Lys Ala Thr
 485 490 495
 Thr Val Thr Gly Thr Arg Cys Gln Ala Trp Ala Ala Gln Glu Pro His
 500 505 510
 Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Ala Asn Pro Trp Ala Asn Leu Glu
 515 520 525
 Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro Trp Cys
 530 535 540
 Tyr Thr Met Asn Pro Gln Lys Leu Phe Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln
 545 550 555 560
 Cys Glu Ser Ser Pro Phe Asp Cys Gly Lys Pro Lys Val Glu Pro Lys
 565 570 575
 Lys Cys Ser Gly Arg Ile Val Gly Gly Cys Val Ala Ile Ala His Ser
 580 585 590
 Trp Pro Trp Gln Ile Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Arg His Phe Cys
 595 600 605
 Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys
 610 615 620
 Leu Glu Arg Ser Ser Arg Pro Ser Thr Tyr Lys Val Val Leu Gly Thr
 625 630 635 640
 His His Glu Leu Arg Leu Ala Ala Gly Ala Gln Gln Ile Asp Val Ser
 645 650 655

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

Ser Ser Pro Ala Ile Ile Thr Gln Asn Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro
675 680 685

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

Trp Gly Glu Thr Gln Asp Ser Ser Asn Ala Gly Val Leu Lys Glu Ala
705 710 715 720

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

Asn Gly Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Val Gly
740 745 750

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

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

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

Ile Asn Trp Ile Glu Arg Ile Met Gln Ser Asn
805 810

<210> 11
<211> 812
5 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 11

Met Asp His Lys Glu Val Ile Leu Leu Phe Leu Leu Leu Lys Pro
1 5 10 15

Gly Gln Gly Asp Ser Leu Asp Gly Tyr Ile Ser Thr Gln Gly Ala Ser
20 25 30

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

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

10

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Ser
 65 70 75 80
 Lys Thr Ser Ser Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Ile Leu Phe Glu Lys
 85 90 95
 Arg Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Ile Gly Asn Ser Tyr Arg
 100 105 110
 Gly Thr Met Ser Arg Thr Lys Ser Gly Val Ala Cys Gln Lys Trp Gly
 115 120 125
 Ala Thr Phe Pro His Val Pro Asn Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Asn
 130 135 140
 Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Gln
 145 150 155 160
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
 165 170 175
 Asn Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys
 180 185 190
 Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala
 195 200 205
 Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe
 210 215 220
 Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu
 225 230 235 240
 Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr
 245 250 255
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser
 275 280 285
 Val Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro
 290 295 300
 His Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu
 305 310 315 320

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr
 325 330 335
 Thr Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys
 340 345 350
 Glu Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro Glu
 355 360 365
 Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser
 370 375 380
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
 385 390 395 400
 Trp Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe
 405 410 415
 Pro Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp
 420 425 430
 Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 435 440 445
 Cys Asn Leu Lys Arg Cys Ser Glu Thr Gly Gly Ser Val Val Glu Leu
 450 455 460
 Pro Thr Val Ser Gln Glu Pro Ser Gly Pro Ser Asp Ser Glu Thr Asp
 465 470 475 480
 Cys Met Tyr Gly Asn Gly Lys Asp Tyr Arg Gly Lys Thr Ala Val Thr
 485 490 495
 Ala Ala Gly Thr Pro Cys Gln Gly Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 500 505 510
 His Ser Ile Phe Thr Pro Gln Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
 515 520 525
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro Trp Cys Tyr
 530 535 540
 Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Leu Cys
 545 550 555 560
 Ala Ser Ala Ser Ser Phe Glu Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys

				565					570					575		
Lys	Cys	Pro	Gly	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	Asn	Pro	His	Ser	
			580					585					590			
Trp	Pro	Trp	Gln	Ile	Ser	Leu	Arg	Thr	Arg	Phe	Thr	Gly	Gln	His	Phe	
		595					600					605				
Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Ala	Pro	Glu	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	
	610					615					620					
Cys	Leu	Glu	Lys	Ser	Ser	Arg	Pro	Glu	Phe	Tyr	Lys	Val	Ile	Leu	Gly	
	625				630					635					640	
Ala	His	Glu	Glu	Tyr	Ile	Arg	Gly	Ser	Asp	Val	Gln	Glu	Ile	Ser	Val	
				645					650						655	
Ala	Lys	Leu	Ile	Leu	Glu	Pro	Asn	Asn	Arg	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Lys	
			660					665					670			
Leu	Ser	Arg	Pro	Ala	Thr	Ile	Thr	Asp	Lys	Val	Ile	Pro	Ala	Cys	Leu	
		675					680					685				
Pro	Ser	Pro	Asn	Tyr	Met	Val	Ala	Asp	Arg	Thr	Ile	Cys	Tyr	Ile	Thr	
	690					695					700					
Gly	Trp	Gly	Glu	Thr	Gln	Gly	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Arg	Leu	Lys	Glu	
	705				710					715					720	
Ala	Gln	Leu	Pro	Val	Ile	Glu	Asn	Lys	Val	Cys	Asn	Arg	Val	Glu	Tyr	
				725					730					735		
Leu	Asn	Asn	Arg	Val	Lys	Ser	Thr	Glu	Leu	Cys	Ala	Gly	Gln	Leu	Ala	
			740					745					750			
Gly	Gly	Val	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Cys	
		755					760					765				
Phe	Glu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Ile	Leu	Gln	Gly	Val	Thr	Ser	Trp	Gly	Leu	
	770					775					780					
Gly	Cys	Ala	Arg	Pro	Asn	Lys	Pro	Gly	Val	Tyr	Val	Arg	Val	Ser	Arg	
	785				790					795					800	
Phe	Val	Asp	Trp	Ile	Glu	Arg	Glu	Met	Arg	Asn	Asn					
				805					810							

<210> 12
 <211> 812
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<400> 12

```

Met Asp His Lys Glu Ile Ile Leu Leu Phe Leu Leu Phe Leu Lys Pro
1          5          10          15

Gly Gln Gly Asp Ser Leu Asp Gly Tyr Val Ser Thr Gln Gly Ala Ser
20          25          30

Leu His Ser Leu Thr Lys Lys Gln Leu Ala Ala Gly Ser Ile Ala Asp
35          40          45

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

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Ser
65          70          75          80

Lys Thr Ser Ser Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Ile Leu Phe Glu Lys
85          90          95

Arg Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Ile Gly Lys Gly Tyr Arg
100         105         110

Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Thr Gly Val Thr Cys Gln Lys Trp Ser
115         120

Asp Thr Ser Pro His Val Pro Lys Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Ser
130         135         140

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

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

Asn Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys
180         185         190

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

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

Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu
 225 230 235 240
 Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Tyr
 245 250 255
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Gly Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser
 275 280 285
 Val Thr Ala Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro
 290 295 300
 His Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu
 310 315 320
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr
 325 330 335
 Thr Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys
 340 345 350
 Gly Ser Ser Val Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Leu Pro Glu
 355 360 365
 Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Gly Asn Gly Lys Ser Tyr
 370 375 380
 Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Asn Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp
 385 390 395 400
 Val Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Lys Thr Pro Ala Asn Phe Pro
 405 410 415
 Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Gln
 420 425 430
 Arg Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 435 440 445
 Cys Asn Leu Lys Arg Cys Ser Glu Thr Gly Gly Gly Val Ala Glu Ser
 450 455 460
 Ala Ile Val Pro Gln Val Pro Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Thr Asp
 465 470 475 480

Cys Met Tyr Gly Asn Gly Lys Glu Tyr Arg Gly Lys Thr Ala Val Thr
 485 490 495

Ala Ala Gly Thr Pro Cys Gln Glu Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Ser
 500 505 510

His Arg Ile Phe Thr Pro Gln Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
 515 520 525

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro Trp Cys Tyr
 530 535 540

Thr Met Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asn Ile Pro Leu Cys
 545 550 555

Ala Ser Leu Ser Ser Phe Glu Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys
 565 570 575

Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala Asn Pro His Ser
 580 585 590

Trp Pro Trp Gln Ile Ser Leu Arg Thr Arg Phe Ser Gly Gln His Phe
 595 600 605

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

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

Ala His Glu Glu Arg Ile Leu Gly Ser Asp Val Gln Gln Ile Ala Val
 645 650 655

Thr Lys Leu Val Leu Glu Pro Asn Asp Ala Asp Ile Ala Leu Leu Lys
 660 665 670

Leu Ser Arg Pro Ala Thr Ile Thr Asp Asn Val Ile Pro Ala Cys Leu
 675 680 685

Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Leu Cys Tyr Ile Thr
 690 695 700

Gly Trp Gly Glu Thr Lys Gly Thr Pro Gly Ala Gly Arg Leu Lys Glu
 705 710 715 720

Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Ala Glu Tyr
 725 730 735

Leu Asn Asn Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala
 740 745 750

Gly Gly Ile Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
 755 760 765

Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu
 770 775 780

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

Tyr Val Asn Trp Ile Glu Arg Glu Met Arg Asn Asp
 805 810

<210> 13

<211> 811

5 <212> PRT

<213> *Erinaceus europaeus*

<400> 13

Met Gln Arg Lys Glu Leu Val Leu Leu Phe Leu Leu Phe Leu Gln Pro
 1 5 10 15

Gly His Gly Ile Pro Leu Asp Asp Tyr Val Thr Thr Gln Gly Ala Ser
 20 25 30

Leu Ser Ser Ser Thr Lys Lys Gln Leu Ser Val Gly Ser Thr Glu Glu
 35 40 45

Cys Ala Val Lys Cys Glu Lys Glu Thr Ser Phe Ile Cys Arg Ser Phe
 50 55 60

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Ser
 65 70 75 80

Lys Ser Thr Pro Val Leu Arg Met Arg Asp Val Ile Leu Phe Glu Lys
 85 90 95

Lys Met Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Val Gly Asn Gly Lys Tyr Tyr Arg
 100 105 110

Gly Thr Val Ser Lys Thr Lys Thr Gly Leu Thr Cys Gln Lys Trp Ser
 115 120 125

Ala Glu Thr Pro His Lys Pro Arg Phe Ser Pro Asp Glu Asn Pro Ser
 130 135 140

Glu Gly Leu Asp Gln Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Lys
 145 150 155 160
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Met Asp Pro Glu Val Arg Tyr Glu Tyr Cys
 165 170 175
 Glu Ile Ile Gln Cys Glu Asp Glu Cys Met His Cys Ser Gly Gln Asn
 180 185 190
 Tyr Val Gly Lys Ile Ser Arg Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Pro
 195 200 205
 Trp Asp Ser Gln Ile Pro His Pro His Gly Phe Ile Pro Ser Lys Phe
 210 215 220
 Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu
 225 230 235 240
 Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Met Asp Arg Asn Lys Arg Trp Glu Tyr
 245 250 255
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser Gly Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Leu Met Gly Asn Gly Glu His Tyr Gln Gly Asn Val Ala
 275 280 285
 Val Thr Val Ser Gly Leu Thr Cys Gln Arg Trp Gly Glu Gln Ser Pro
 290 295 300
 His Arg His Asp Arg Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Cys Lys Asn Leu Asp
 305 310 315 320
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Ala Pro Trp Cys Phe
 325 330 335
 Thr Thr Asn Ser Ser Val Arg Trp Glu Phe Cys Lys Ile Pro Asp Cys
 340 345 350
 Val Ser Ser Ala Ser Glu Thr Glu His Ser Asp Ala Pro Val Ile Val
 355 360 365
 Pro Pro Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Gly Asn Gly
 370 375 380
 Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys

His Gln Glu Thr Arg Leu Glu Arg Asp Val Gln Ile Lys Gly Val Thr
 645 650 655

 Lys Met Phe Leu Glu Pro Tyr Arg Ala Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu
 660 665 670

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

 Asn Ser Asn Tyr Met Val Ala Asp Arg Ser Leu Cys Tyr Ile Thr Gly
 690 695 700

 Trp Gly Glu Thr Lys Gly Thr Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala
 705 710 715 720

 Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Gln Glu Leu Leu
 725 730 735

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

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

 Glu Lys Asp Arg Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly
 770 775 780

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

 Val Ser Trp Leu Gln Asp Val Met Arg Asn Asn
 805 810

<210> 14
 <211> 780
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 14

Met Glu Gln Arg Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Lys Pro
 1 5 10 15

 Gly Gln Ala Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser
 20 25 30

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

5

10

Cys Ala Ala Arg Cys Glu Ala Glu Thr Glu Phe Thr Cys Arg Ser Phe
 50 55 60

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Val Met Ala Glu Asn Ser
 65 70 75 80

Lys Ser Ser Ala Ile Ile Arg Arg Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys
 85 90 95

Arg Met Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Ile Gly Asn Gly Arg Ser Tyr Arg
 100 105 110

Gly Thr Lys Ser Lys Thr Lys Thr Gly Phe Thr Cys Gln Lys Trp Ser
 115 120 125

Ser Ser Tyr Pro His Lys Pro Asn Phe Thr Pro Lys Lys Tyr Pro Ala
 130 135 140

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

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Asp Glu Arg Phe Asp Tyr Cys
 165 170 175

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

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

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

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

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

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

His Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Lys Val Ala
 275 280 285

Arg Thr Lys Ser Gly Leu Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro
 290 295 300

His Leu His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asp Leu Asp
 305 310 315 320
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Ser Ala Pro Trp Cys Tyr
 325 330 335
 Thr Thr Asp Ser Lys Val Arg Trp Glu His Cys Asp Ile Pro Ser Cys
 340 345 350
 Ala Ser Ser Pro Thr Ser Val Glu Pro Leu Asp Ala Pro Ala Pro Pro
 355 360 365
 Glu Glu Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Gly Asn Gly Gln Ser
 370 375 380
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Arg Lys Cys Gln Ser
 385 390 395 400
 Trp Leu Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Arg Thr Pro Gln Asn Tyr
 405 410 415
 Pro Asn Ala Asp Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp
 420 425 430
 Ile Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 435 440 445
 Cys Asn Leu Arg Arg Cys Ser Glu Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Thr
 450 455 460
 Val Pro Thr Ala Gln Leu Pro Arg Pro Glu Ala Thr Phe Glu Pro Asp
 465 470 475 480
 Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Lys Ala Thr Thr
 485 490 495
 Ala Asp Gly Thr Pro Cys Gln Gly Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 500 505 510
 His Asn Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Arg
 515 520 525
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Thr Asn Gly Pro Trp Cys Tyr
 530 535 540
 Thr Met Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
 545 550 555 560

Ala Ser Ser Ser Ser Tyr Asp Cys Gly Lys Pro Lys Val Glu Pro Lys
565 570 575

Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala Asn Pro His Ser
580 585 590

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

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

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

His Lys Glu Val Asn Leu Glu Leu Asp Val Gln Asp Ile Asp Val Ala
645 650 655

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

Ser Ser Leu Glu Trp Ala Trp Thr Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu
675 680 685

Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Phe Glu Tyr
690 695 700

Leu Asn Gly Arg Val Arg Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala
705 710 715 720

Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
725 730 735

Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu
740 745 750

Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg
755 760 765

Phe Val Asp Trp Ile Glu Arg Thr Met Arg Asn Asn
770 775 780

<210> 15
<211> 827
<212> PRT
<213> *Pan troglodytes*

5

<400> 15

Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
1 5 10 15

Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser
20 25 30

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

Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Lys Glu Phe Thr Cys Arg Tyr Phe
50 55 60

His Cys Arg Cys Thr Tyr Pro Glu Ile Cys Asn Ser Asp Gly Lys Ala
65 70 75 80

Phe Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn
85 90 95

Arg Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu
100 105 110

Lys Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr
115 120 125

Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp
130 135 140

Ser Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro
145 150 155 160

Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro
165 170 175

Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr
180 185 190

Cys Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu
195 200 205

Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln
210 215 220

Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys
225 230 235 240

Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly

Asp Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr
 500 505 510
 Thr Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His
 515 520 525
 Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu
 530 535 540
 Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys
 545 550 555 560
 Tyr Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln
 565 570 575
 Cys Ala Ser Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys
 580 585 590
 Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser
 595 600 605
 Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Leu Gly Met His Phe Cys
 610 615 620
 Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys
 625 630 635 640
 Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala
 645 650 655
 His Gln Glu Val Lys Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser
 660 665 670
 Arg Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Thr Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu
 675 680 685
 Ser Ser Pro Ala Ile Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Als Cys Leu Pro
 690 695 700
 Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly
 705 710 715 720
 Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala
 725 730 735
 Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Asn Glu Phe Leu
 740 745 750

Asn Gly Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly
 755 760 765

Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe
 770 775 780

Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly
 785 790 795 800

Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe
 805 810 815

Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 820 825

<210> 16
 <211> 769
 <212> PRT
 <213> *Ailuropoda melanoleuca*

5

<400> 16

Phe Val Arg Arg Ser Phe Glu Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Ala
 1 5 10 15

Ile Met Ala Glu Asn Ser Lys Ser Ser Ala Val Phe Arg Met Arg Asp
 20 25 30

Val Ile Leu Phe Gln Lys Arg Ile Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly
 35 40 45

Asn Gly Lys Thr Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Val
 50 55 60

Ala Cys Gln Lys Trp Ser Asp Thr Phe Pro His Lys Pro Asn Tyr Thr
 65 70 75 80

Pro Glu Lys His Pro Leu Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn
 85 90 95

Pro Asp Asn Asp Glu Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Asn
 100 105 110

Gln Arg Phe Asp Tyr Cys Ser Ile Pro Gln Cys Glu Asp Glu Cys Met
 115 120 125

His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Glu Gly Lys Val Ser Lys Thr Lys Ser
 130 135 140

10

Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asn Ser Gln Thr Pro His Ala His Gly
 145 150 155 160

Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys
 165 170 175

Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Met Asp Pro
 180 185 190

Asn Lys Arg Trp Glu Phe Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro
 195 200 205

Pro Pro Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Lys Gly Glu Asn
 210 215 220

Tyr Arg Gly Lys Val Ser Val Thr Ala Ser Gly His Thr Cys Gln Arg
 225 230 235 240

Trp Ser Glu Gln Thr Pro His Lys His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe
 245 250 255

Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu
 260 265 270

Ser Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Ser Glu Val Arg Trp Glu His
 275 280 285

Cys Ser Ile Pro Ser Cys Glu Ser Ser Pro Leu Thr Leu Asp Ser Leu
 290 295 300

Asp Thr Pro Ala Ser Ile Pro Pro Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu
 305 310 315 320

Cys Tyr Gln Gly Asn Gly Gln Thr Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr
 325 330 335

Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ser Pro His Arg
 340 345 350

His Glu Lys Thr Pro Glu Arg Phe Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn
 355 360 365

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Lys Ser Pro Trp Cys Tyr Thr Thr
 370 375 380

Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Phe Cys Asn Leu Lys Lys Cys Leu Asp
 385 390 395 400

Thr Glu Glu Ser Gly Thr Ser Ser Pro Thr Val Pro Gln Val Pro Ser
 405 410 415
 Gly Glu Glu Pro Ser Glu Thr Asp Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly
 420 425 430
 Tyr Arg Gly Lys Lys Ala Thr Thr Val Leu Gly Ile Pro Cys Gln Glu
 435 440 445
 Trp Thr Ala Gln Glu Pro His Lys His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr
 450 455 460
 Asn Pro Arg Ala Glu His Leu Leu Cys Pro Thr Cys Leu Val Pro Ser
 465 470 475 480
 Val Pro Thr Val Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Leu Phe Leu Asp
 485 490 495
 Val Asn Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Phe Asp
 500 505 510
 Tyr Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ala Ser Gly Ser Phe Asp Cys Gly Lys
 515 520 525
 Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys
 530 535 540
 Val Ala Asn Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Ile Ser Leu Arg Thr Arg
 545 550 555 560
 Phe Gly Gln His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val
 565 570 575
 Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Arg Ser Pro Arg Pro Ala Ala Tyr
 580 585 590
 Lys Val Ile Leu Gly Ala His Arg Glu Phe Asn Leu Glu Ser Asp Val
 595 600 605
 Gln Glu Ile Glu Val Ser Lys Leu Phe Leu Glu Pro Thr His Ala Asp
 610 615 620
 Ile Ala Leu Ile Lys Leu Gln Ser Pro Ala Val Leu Thr Ser Lys Val
 625 630 635 640
 Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr

					645					650					655	
Leu	Cys	Tyr	Ile	Thr	Gly	Trp	Gly	Glu	Thr	Gln	Gly	Thr	Phe	Gly	Val	
			660					665					670			
Gly	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	Gln	Leu	Pro	Val	Ile	Glu	Asn	Lys	Val	Cys	
		675					680					685				
Asn	Arg	Tyr	Glu	Tyr	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Ser	Thr	Glu	Leu	Cys	
	690					695					700					
Ala	Gly	Asn	Leu	Ala	Gly	Gly	Thr	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	
705					710					715					720	
Gly	Pro	Leu	Val	Cys	Phe	Glu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Ile	Leu	Gln	Gly	Val	
				725					730					735		
Thr	Ser	Trp	Gly	Leu	Gly	Cys	Ala	Arg	Pro	Asn	Lys	Pro	Gly	Val	Tyr	
			740					745					750			
Val	Arg	Val	Ser	Arg	Phe	Val	Thr	Trp	Ile	Glu	Glu	Ile	Met	Arg	Asn	
		755					760					765				

Asn

<210> 17
 <211> 334
 5 <212> PRT
 <213> *Papio hamadryas*
 <400> 17

Ile	Arg	Leu	Asp	Cys	Met	Phe	Gly	Asn	Gly	Lys	Arg	Tyr	Arg	Gly	Lys
1				5					10					15	
Lys	Ala	Thr	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Pro	Cys	Gln	Glu	Trp	Ala	Ala	Lys
			20					25					30		
Glu	Pro	His	Ser	His	Leu	Ile	Phe	Thr	Pro	Glu	Thr	Tyr	Pro	Arg	Ala
		35					40					45			
Gly	Leu	Glu	Lys	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Val	Gly	Gly
	50					55					60				
Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asn	Pro	Arg	Lys	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Asp
65					70					75					80
Val	Pro	Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Ser	Phe	Asp	Cys	Gly	Lys	Pro	Gln	Val

ES 2 583 082 T3

				85						90					95
Glu	Pro	Lys	Lys	Cys	Pro	Gly	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	His
			100					105					110		
Ala	His	Ser	Trp	Pro	Trp	Gln	Val	Ser	Leu	Arg	Thr	Arg	Phe	Gly	Met
		115					120					125			
His	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Ser	Pro	Glu	Trp	Val	Leu	Thr	Ala
	130					135					140				
Ala	His	Cys	Leu	Glu	Lys	Ser	Pro	Arg	Pro	Ser	Phe	Tyr	Lys	Val	Ile
145					150					155					160
Leu	Gly	Ala	His	Gln	Glu	Val	Arg	Leu	Glu	Pro	His	Val	Gln	Glu	Ile
				165					170					175	
Glu	Val	Ser	Lys	Met	Phe	Ser	Glu	Pro	Ala	Gly	Ala	Asp	Ile	Ala	Leu
			180					185					190		
Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Pro	Ala	Ile	Ile	Thr	Asp	Lys	Val	Ile	Pro	Ala
		195					200					205			
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	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu
225					230					235					240
Lys	Glu	Ala	Arg	Leu	Pro	Val	Ile	Glu	Asn	Lys	Val	Cys	Asn	Arg	Tyr
				245					250					255	
Glu	Phe	Leu	Asn	Gly	Arg	Val	Lys	Ser	Thr	Glu	Leu	Cys	Ala	Gly	His
			260					265					270		
Leu	Ala	Gly	Gly	Thr	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu
		275					280					285			
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
Ser	Arg	Phe	Val	Thr	Trp	Ile	Glu	Gly	Val	Met	Arg	Asn	Asn		
				325					330						

<211> 343
 <212> PRT
 <213> *Ovis aries*

5 <400> 18

Ala Pro Gln Ala Pro Ser Val Glu Asn Pro Pro Glu Ala Asp Cys Met
 1 5 10 15

Leu Gly Ile Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Lys Ala Thr Thr Val Ala
 20 25 30

Gly Val Pro Cys Gln Glu Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His Gly
 35 40 45

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

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

Asn Pro Arg Lys Leu Phe Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Gln Cys Glu Ser
 85 90 95

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

Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala Thr Pro His Ser Trp Pro Trp Gln
 115 120 125

Val Ser Leu Arg Arg Arg Ser Arg Glu His Phe Cys Gly Gly Thr Leu
 130 135 140

Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Asp Ser Ile
 145 150 155 160

Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Thr Val Ile Leu Gly Ala His Tyr Glu Met
 165 170 175

Ala Arg Glu Ala Ser Val Gln Glu Ile Pro Val Ser Arg Leu Phe Leu
 180 185 190

Glu Pro Ser Arg Ala Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala
 195 200 205

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

Val Val Ala Asp Lys Thr Val Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr
 225 230 235 240

Gln Gly Thr Phe Gly Val Gly Arg Leu Lys Glu Ala Arg Leu Pro Val
 245 250 255

Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Tyr Leu Asn Gly Arg Val
 260 265 270

Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly Asp Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser
 275 280 285

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys
 290 295 300

Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro
 305 310 315 320

Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Thr Tyr Val Pro Trp Ile
 325 330 335

Glu Glu Thr Met Arg Arg Tyr
 340

<210> 19
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 19

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

Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro
 20 25 30

Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly
 35 40 45

Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu
 50 55 60

Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln
 65 70 75 80

Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu
 85 90 95

10

Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser
 100 105 110
Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro
 115 120 125
Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly
 130 135 140
Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu
 145 150 155 160
Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly
 165 170 175
Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr
 180 185 190
Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys
 195 200 205
Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala
 210 215 220
Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr
 225 230 235 240
Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 245

- <210> 20
- <211> 44
- 5 <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- <220>
- <223> cebador oligonucleotídico
- 10
- <400> 20
- gttcggtgct ggtctgttga aacaggcaca attacctgtg attg 44

- <210> 21
- <211> 44
- 15 <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- <220>
- <223> cebador oligonucleotídico
- 20
- <400> 21
- caatcacagg taattgtgcc tgttcaaca gaccagcacc gaac 44

- 25 <210> 22

<211> 768
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <223> microplasma mutante E138Q

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(6)
 <223> sitio de restricción XhoI

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (7)..(12)
 <223> sitio de escisión KEX2 codificante

<220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (763)..(768)
 <223> sitio de restricción XbaI

<400> 22

```

ctcgagaaaa gagcaccttc attcgactgt ggtaagcctc aggtcgaacc taagaagtgt      60
ccaggtcgtg ttgtcggtag ctgtgtggct catcctcatt cttggccttg gcaagtgtct      120
cttagaacta gatttggatg gcacttctgt ggtggcacct tgatctcacc tgaatgggtc      180
ttaacgcag ctcatgtct ggagaagtca ccacgtccat cttcatacaa ggtcatcctt      240
ggcgcacatc aggaagtcaa tcttgagcct catgttcagg agatcgaagt ctctcgtttg      300
ttcttggaac caactcgtaa agacattgct cttctgaagc tgatcatctc tgccgtgatt      360
accgacaagg taattcctgc ctgcttgccct agtcctaatt acgtcgttgc cgaccgtacc      420
gaatgcttca ttactggttg gggtagagact caaggtagct tcggtgctgg tctgttgaaa      480
caggcacaat tacctgtgat tgagaacaag gtttgtaaca gatacgagtt cctgaatggt      540
cgtgttcagt ccactgagtt gtgtgcaggt caccttgtag gtggtactga tagttgtcaa      600
ggtgattctg gtggaccact ggtgtgcttc gagaaggata agtacatctt acaagggtgt      660
acgtcttggg gtcttggatg tgctcgtcct aacaagccag gtgtctacgt cagagtctcc      720
agattcgtaa cttggatcga aggtgtcatg cgtaacaact aatctaga      768
  
```

25 <210> 23
 <211> 253
 <212> PRT
 30 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> microplasma mutante E138Q

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(2)
 <223> codificado por nucleótidos de sitio de restricción XhoI

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(4)
 <223> sitio de escisión KEX2

<400> 23

5

Leu Glu Lys Arg Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu
 1 5 10 15

Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro
 20 25 30

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

Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu
 65 70 75 80

Gly Ala His Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu
 85 90 95

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

Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys
 115 120 125

Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile
 130 135 140

Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 145 150 155 160

Gln Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu
 165 170 175

Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu
 180 185 190

Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val
 195 200 205

Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly
 210 215 220

Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser
 225 230 235 240

Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 245 250

<210> 24
 <211> 768
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> microplasma mutante E138Q K147E
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> sitio de restricción XhoI
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(12)
 <223> sitio de escisión KEX2 codificante
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (763)..(768)
 <223> sitio de restricción XbaI
 25
 <400> 24

ctcgagaaaa gagcaccttc attcgactgt ggtaagcctc aggtcgaacc taagaagtgt 60
ccaggtegtg ttgtcgggtg ctgtgtggct catcctcatt cttggccttg gcaagtgtct 120
cttagaacta gatttggatg gcaacttctgt ggtggcacct tgatctcacc tgaatgggtc 180
ttaaccgcag ctcatgtct ggagaagtca ccacgtccat cttcatacaa ggcatcctt 240
ggcgcacatc aggaagtcaa tcttgagcct catgttcagg agatcgaagt ctctcgtttg 300
ttcttggaac caactcgtaa agacattgct cttctgaagc tgtcatctcc tgccgtgatt 360
accgacaagg taattcctgc ctgcttgccct agtcctaatt acgtcgttgc cgaccgtacc 420
gaatgcttca ttactggtg gggtgagact caaggtagct tcggtgctgg tctgttgaaa 480
caggcacaat tacctgtgat tgagaacgaa gtgtgtaaca gatacgagt cctgaatggt 540
cgtgttcagt ccactgagtt gtgtgcaggt caccttgtag gtggtactga tagttgtcaa 600
ggtgattctg gtggaccact ggtgtgcttc gagaaggata agtacatctt acaagggtgtt 660
acgtcttggg gtcttgatg tgctcgtcct aacaagccag gtgtctacgt cagagtctcc 720
agattcgtaa cttggatcga aggtgtcatg cgtaacaact aatctaga 768
 <210> 25
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> microplasma mutante E138Q K147E
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(2)
 <223> codificado por nucleótidos de sitio de restricción XhoI
 40
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(4)
 <223> sitio de escisión KEX2

5 <400> 25

Leu Glu Lys Arg Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu
 1 5 10 15

Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro
 20 25 30

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

Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu
 65 70 75 80

Gly Ala His Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu
 85 90 95

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

Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys
 115 120 125

Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile
 130 135 140

Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 145 150 155 160

Gln Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Glu Val Cys Asn Arg Tyr Glu

ES 2 583 082 T3

```

ctcgagaaaa gagcaccttc attcgactgt ggttaagcctc aggtcgaacc taagaagtgt      60
ccaggtcgtg ttgtcgggtg ctgtgtggct catcctcatt cttggccttg gcaagtgtct      120
cttagaacta gatttggtat gcaottctgt ggtggcacct tgatctcacc tgaatgggtc      180
ttaaccgcag ctcatgtctt ggagaagtca ccacgtccat cttcatacaa ggtcatcctt      240
ggcgcacatc aggaagtcaa tcttgagcct catgttcagg agatcgaagt ctctcgtttg      300
ttcttggaac caactcgtaa agacattgct cttctgaagc tgtcatctcc tgccgtgatt      360
accgacaagg taattcctgc ctgcttgccct agtcttaatt acgtcgttgc cgaccgtacc      420
gaatgcttca ttactggttg gggtgagact caaggtacgt tcggtgctgg tctggtgaaa      480

caggcacaat tacctgtgat tgagaaccac gtgtgtaaca gatacgagtt cctgaatgga      540
cacgtgcagt ccactgagtt gtgtgcaggt caccttgacg gtggtactga tagttgtcaa      600
ggtgattctg gtggaccact ggtgtgcttc gagaaggata agtacatctt acaaggtggt      660
acgtcttggg gtcttgatg tgctcgtcct aacaagccag gtgtctacgt cagagtctcc      720
agattcgtaa cttggatcga aggtgtcatg cgtaacaact aatctaga      768

```

```

5 <210> 27
  <211> 253
  <212> PRT
  <213> secuencia artificial

10 <220>
  <223> microplasma mutante E138Q K147E R158H

15 <220>
  <221> MISC_FEATURE
  <222> (1)..(2)
  <223> codificado por nucleótidos de sitio de restricción XhoI

20 <220>
  <221> MISC_FEATURE
  <222> (3)..(4)
  <223> sitio de escisión KEX2

  <400> 27

```

ES 2 583 082 T3

Leu Glu Lys Arg Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu
 1 5 10 15
 Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro
 20 25 30
 His Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His
 35 40 45
 Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60
 His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu
 65 70 75 80
 Gly Ala His Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu
 85 90 95
 Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu
 100 105 110
 Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys
 115 120 125
 Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile
 130 135 140
 Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 145 150 155 160
 Gln Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn His Val Cys Asn Arg Tyr Glu
 165 170 175
 Phe Leu Asn Gly His Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu
 180 185 190
 Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val
 195 200 205
 Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly
 210 215 220
 Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser
 225 230 235 240
 Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 245 250

REIVINDICACIONES

1. Una variante de plasminógeno aislada o plasmina obtenida a partir de esta, o una variante de plasmina aislada, o un derivado proteolíticamente activo o inactivo reversible de cualquiera de dichas plasminas caracterizada por que:
- 5 comprende en su dominio catalítico una mutación del aminoácido glutamato en la posición 138 del dominio catalítico de plasmina humana, o del resto de aminoácido correspondiente de un dominio catalítico de plasmina no humana, en el que dicho dominio catalítico de plasmina humana comienza por el aminoácido valina en la posición 1, que es el mismo aminoácido valina que aparece en la posición 562 de Glu-plasminógeno humano.
- 10 2. La variante de plasminógeno, variante de plasmina, o derivado de plasmina según la reivindicación 1 que comprende además la mutación de uno o más de los aminoácidos lisina o arginina del dominio catalítico en un aminoácido no lisina o no arginina.
- 15 3. El plasminógeno, plasmina, o derivado de plasmina según la reivindicación 2, en el que dicho aminoácido lisina o arginina se selecciona entre:
- (i) lisina en la posición 137 del dominio catalítico de plasmina humana, o lisina o arginina correspondiente de un dominio catalítico de plasmina no humana;
- 20 (ii) lisina en la posición 147 del dominio catalítico de plasmina humana, o lisina o arginina correspondiente de un dominio catalítico de plasmina no humana; o
- (iii) arginina en la posición 158 del dominio catalítico de plasmina humana, o arginina o lisina correspondiente de un dominio catalítico de plasmina no humana;
- 25 en el que dicho dominio catalítico de plasmina humana comienza por el aminoácido valina en la posición 1, que es el mismo aminoácido valina que aparece en la posición 562 de Glu-plasminógeno humano.
4. El plasminógeno, plasmina, o derivado de plasmina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho aminoácido glutamato en la posición 138 del dominio catalítico de plasmina humana, o el resto de aminoácido correspondiente de un dominio catalítico de plasmina no humana, se muta a glutamina.
- 30 5. El plasminógeno, plasmina, o derivado de plasmina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho dominio catalítico de plasmina humana es el dominio catalítico comprendido en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 23, 25 o 27.
- 35 6. La variante de plasmina o derivado de plasmina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada además por que su constante de autólisis es como máximo 95 % de la constante de la autólisis de plasmina de tipo natural.
- 40 7. La variante de plasmina o derivado de plasmina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada además por que la constante catalítica k_{cat} se encuentra en el intervalo de 10 % a 200 % de k_{cat} de plasmina de tipo natural.
- 45 8. La variante de plasmina o derivado de plasmina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada además por que su constante de autólisis es como máximo 95 % de la constante de la autólisis de plasmina de tipo natural y su constante catalítica k_{cat} se encuentra en el intervalo de 10 % a 200 % de k_{cat} de plasmina de tipo natural.
- 50 9. La variante de plasminógeno, la variante de plasmina, o el derivado de plasmina aislados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho plasminógeno o plasmina es Glu-plasminógeno o Glu-plasmina, Lys-plasminógeno o Lys-plasmina, midiplasminógeno o midiplasmina, miniplasminógeno o miniplasmina, microplasminógeno o microplasmina, deltaplasminógeno o deltaplasmina.
- 55 10. La variante de plasminógeno, la variante de plasmina, o el derivado de plasmina aislados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una combinación de cualquiera de los mismos para su uso como medicamento.
11. Una composición que comprende la variante de plasminógeno, variante de plasmina, o derivado de plasmina aislados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una combinación de cualquiera de los mismos, y al menos uno de un diluyente, transportador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 60 12. La composición según la reivindicación 11, que comprende además al menos uno de un anticoagulante, un agente trombolítico, un agente antiinflamatorio, un agente antiviral, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, un antihistamínico o un anestésico.
- 65 13. La variante de plasminógeno, la variante de plasmina, o derivado de plasmina aislados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en la inducción o el favorecimiento de la lisis de un depósito patológico de fibrina en un sujeto; para su uso en la inducción de un desprendimiento vítreo posterior en el ojo y/o para su uso en

la inducción de una licuefacción del vítreo en el ojo, o para su uso en la facilitación de una vitrectomía quirúrgica en el ojo de un sujeto; para su uso en el desbridamiento enzimático de tejido lesionado de un sujeto; para su uso en la reducción de fibrinógeno circulante, o para su uso en la reducción de los niveles de α 2-antiplasmina en un sujeto; o para su uso en la reducción del riesgo de depósito patológico de fibrina.

5 14. Un método para la exploración de una variante de plasmina autoproteolíticamente estable, comprendiendo dicho método:

10 (i) la mutación de aminoácidos glutamato en las posiciones 138 del dominio catalítico de plasmina humana, o del resto de aminoácido correspondiente de una plasmina no humana, en un aminoácido diferente del aminoácido natural,

(ii) la determinación de la estabilidad autoproteolítica del mutante obtenido a partir de (i), y

15 (iii) la selección a partir de (ii) de un mutante con una constante de autólisis que es como máximo 95 % de la constante de autólisis de plasmina de tipo natural;

en el que dicho dominio catalítico de plasmina humana comienza por el aminoácido valina en la posición 1, que es el mismo aminoácido valina que aparece en la posición 562 de Glu-plasminógeno humano.

20 15. El método según la reivindicación 14, que comprende además una etapa en la que se determina la actividad proteolítica de la variante de plasmina autoproteolíticamente estable.

25 16. Un método para mejorar la estabilidad de almacenamiento a largo plazo de una composición que comprende plasmina, comprendiendo dicho método la etapa de identificación de una variante de plasmina autoproteolíticamente estable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 capaz de almacenarse durante un periodo prolongado sin pérdida significativa de la actividad proteolítica.

17. Un método para producir una variante de plasminógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo dicho método las etapas de:

30 (i) introducir un ácido nucleico codificante de un plasminógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en una célula hospedadora adecuada capaz de expresar dicho plasminógeno;

(ii) cultivar la célula hospedadora obtenida en (i) en condiciones y durante un tiempo suficiente para la expresión de dicho plasminógeno en dicha célula hospedadora; y

35 (iii) recoger el plasminógeno expresado en (ii).

18. El método según la reivindicación 17, que comprende además una etapa (iv) en la que se purifica el plasminógeno recogido en (iii).

40 19. Un método para producir una variante de plasmina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo dicho método las etapas de:

(i) introducir un ácido nucleico codificante de un plasminógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en una célula hospedadora adecuada capaz de expresar dicho plasminógeno;

45 (ii) cultivar la célula hospedadora obtenida en (i) en condiciones y durante un tiempo suficiente para la expresión de dicho plasminógeno en dicha célula hospedadora;

(iii) recoger el plasminógeno expresado en (ii);

(iv) activar el plasminógeno de (iii) en plasmina.

50 20. El método según la reivindicación 19, en el que el plasminógeno recogido en (iii) se purifica antes de la activación en (iv).

21. El método según la reivindicación 19 o 20, en el que se purifica la plasmina activa obtenida en (iv).

55 22. El método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que la plasmina activa se derivatiza y/o se inactiva de forma reversible.

23. Una secuencia de ácido nucleico aislada codificante de la variante de plasminógeno o variante de plasmina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

60 24. Un vector recombinante que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 23.

25. Una célula hospedadora transformada con el ácido nucleico según la reivindicación 23 o el vector según la reivindicación 24.

1	11	21	31	41	51
EPLDDYVNTQ	GASLFSVTKK	QLGAGSIEEC	AAKCEEDEEF	TCRAFQYHSK	EQQCVMJMAEN
61	71	81	91	101	111
RKSSIIIRM	DVVLFEKKVY	ISECKTGNGK	NYRGTMSTK	NGITCQKWSS	TSPHRPRFSP
121	131	141	151	161	171
ATHPSEGLEE	NYCRNPDNDP	QGPWCYTDP	EKRYDYCDIL	ECEEECMHCS	GENYDGKISK
181	191	201	211	221	231
TMSGLEQAW	DSQSPHAGY	IPSKFPNKNL	KKNYCRNPD	ELRPWCFTTD	PNKRWELCDI
241	251	261	271	281	291
PRCTTPPPSS	GETYQCLKGT	GENYRGNVAV	TVSGHTCOHW	SAQTPHTHNR	TRENFPCKNL
301	311	321	331	341	351
DENYCRNPDG	KRAPWCHTTN	SOVRWEYCKI	PSCDSSPVST	EQLAPTAPPE	LTPVVQDCYH
361	371	381	391	401	411
GDQSYRGTS	STTTGKKCQ	SWSSMTPHRH	QKTPENYPNA	GLTMNYCRNP	DADKGPWCFT
421	431	441	451	461	471
TDPSVRWEYC	NLKKCSSTEA	SVVAPPVVVL	LPDVETPS	EE DCMFGNGKGY	RGKRATTVTG
481	491	501	511	521	531
TPCQDWAAQE	PHRHSIFTPE	TNPRAGLEKN	YCRNPDGDVG	GPWCYTTNPR	KLYDYCDVPO
541	551	561	571	581	591
CAAPSFDCKG	PQVEPKKCPG	RVVGGCVAHP	HSWPWQVSLR	TRFGMHFCGG	TLISPEWVLT
601	611	621	631	641	651
	49	59	69	79	89
					99
AACLEKSPR	PSSYKVI LGA	HQEVNLEPHV	QEIEVSRLEFL	EPTRKQIAL	KLSSPAVITD
661	671	681	691	701	711
	109	119	129	139	149
					159
KVIPACLPSF	NYVVADRTEC	FITGWGETQG	TFGAGLLKEA	QLPVIENKVC	NRYEFLNGRV
721	731	741	751	761	771
	169	179	189	199	209
					219
QSTELCAGHL	AGGTDSCQGD	SBGPLVCFEK	DKYILQGVTS	WGLGCARPKN	PGVYVRVSRF
781	791				
	229				
VTWIEGVMRN	N (SEQ ID NO:1)				

FIGURA 1

ES 2 583 082 T3

Alineación por COBALT (herramienta de alineación múltiple basada en restricciones) de las secuencias de aminoácido de plasminógeno

N.º línea en la alineación secuencial

- 1: Homo sapiens /Genbank AAA36451/ humano (SEQ ID NO:1)
- 2: Canis familiaris /Genbank XP_533468/ perro (SEQ ID NO:2)
- 3: Pan troglodytes /Genbank XP_001152889/ chimpancé/ isoforma 3 (SEQ ID NO:3)
- 4: Pan troglodytes /Genbank XP_001152830/ chimpancé/ isoforma 2 (SEQ ID NO:4)
- 5: Pan troglodytes /Genbank XP_518844/ chimpancé/ isoforma 4 (SEQ ID NO:5)
- 6: Macaca mulatta /Genbank NP_001036540/ macaco Rhesus (SEQ ID NO:6)
- 7: Pongo abelii /Genbank NP_001126035/ orangután de Sumatra (SEQ ID NO:7)
- 8: Sus scrofa /Genbank NP_001038055/ cerdo (SEQ ID NO:8)
- 9: Bos Taurus /Genbank DAA25966/ ganado (SEQ ID NO:9)
- 10: Equus caballus /Genbank XP_001500552/ caballo (SEQ ID NO:10)
- 11: Mus musculus /Genbank EDL02061/ caballo ratonero (SEQ ID NO:11)
- 12: Rattus norvegicus /Genbank NP_445943/ rata noruega (SEQ ID NO:12)
- 13: Erinaceus europaeus /Genbank AAC48717/ erizo de Europa Occidental (SEQ ID NO:13)
- 14: Oryctolagus cuniculus /Genbank XP_002715012/ conejo (SEQ ID NO:14)
- 15: Pan troglodytes /Genbank XP_001152435/ chimpancé/ isoforma 1 (SEQ ID NO:15)
- 16: Ailuropoda melanoleuca /Genbank EFB19688/ panda (SEQ ID NO:16)
- 17: Papio hamadryas /Genbank AAB97887/ babuino (SEQ ID NO:17)
- 18: Ovis aries /Genbank P81286/ oveja (SEQ ID NO:18)

FIGURA 2/1

			1	11	21	31	41
1	1	-----MEHKEVLLLLLFLKSGQG	EPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEECAAKCEEDEEFTCR-----				
2	1	-----MEHKEVLLLLLFLKSGHG	SLLDDYVNTQGASVFSLTKKQLSVGSIEECAAKCEEETGFTCR-----				
3	1	-----MEHKEVLLLLLFLKSGQG	EPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEECAAKCEDKEFTCR-----				
4	1	-----MEHKEVLLLLLFLKSGQG	EPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEECAAKCEDKEFTCR-----				
5	1	-----MLMDYEGQG	EPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEECAAKCEDKEFTCR-----				
6	1	-----MEHKEVLLLLLFLKSGQG	EPLDDYVNTKGASLFSITKKQLGAGSIEECAAKCEEEETCR-----				
7	1	-----MEHKEVLLLLLFLKSGQG	EPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLRAGSIEECAAKCEEEKEFTCR-----				
8	1	-----MDHKEVLLLLLFLKSGLG	DSLDDYVNTQGAFLSLSRKQVAARSVEECAAKCEAETNFCR-----				
9	1	MLPASPKMEHKAVVFLJLLFLKSGLG	DLLDDYVNTQGASLLSLSRKNLAGRSVEDCAAKCEEETDFVCR-----				
10	1	-----MEHQEVVLLLLLFLKSGHG	DILDDYVTTQGASLFTFTRKPLSASSIEECAAKCTEETAFCR-----				
11	1	-----MDHKEVILLFLLLKPGQG	DSLDDYVNTQGASLFSVTKKQLAAGGVADCLAKCEGETDFVCR-----				
12	1	-----MDHKEIILLFLLFLKPGQG	DSLDDYVNTQGASLHSLTKKQLAAGSADCLAKCEGETDFVCR-----				
13	1	-----MQRKELVLLFLLFLQPGHG	IPLDDYVTTQGASLSSSTKKQLSVGSIEECAAVKCEKETSFCR-----				
14	1	-----MEQRAVLLLLLFLKPGQA	EPLDDYVNTQGASLFSFTKKQLGAASIAECAARCEAETEFTCR-----				
15	1	-----MEHKEVLLLLLFLKSGQG	EPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEECAAKCEDKEFTCRYFHCRCCTYPEI				
16	1	-----	-----FVRR-----				

FIGURA 2/2

			51	61	71	81	91	101	111
1	63	-----	AFQYHSKEQQCV	IMAENRKSSII	IRMRDVVLFEK	KVYLSECKTGN	GKNYRGTMSKT	KNGITCQKWS	SSTSPHRPR
2	63	-----	SFQYHSKEQQCV	IMPENSKSSIV	FRMRDVVLFEK	RIVLSECKTGN	GKTYRGTMAKT	KNDVACQKWS	DNSPHKPN
3	63	-----	AFQYHSKEQQCV	IMAENRKSSII	IRMRDVVLFEK	KVYLSECKTGN	GKNYRGTMSKT	KNGITCQKWS	SSTSPHRPR
4	63	-----	AFQYHSKEQQCV	IMAENRKSSII	IRMRDVVLFEK	KVYLSECKTGN	GKNYRGTMSKT	KNGITCQKWS	SSTSPHRPR
5	53	-----	AFQYHSKEQQCV	IMAENRKSSII	IRMRDVVLFEK	KVYLSECKTGN	GKNYRGTMSKT	KNGITCQKWS	SSTSPHRPR
6	63	-----	SFQYHSKEQQCV	IMAENRKSSIV	FRMRDVVLFEK	KVYLSECKTGN	GKNYRGTMSKT	RTGITCQKWS	SSTSPHRPT
7	63	-----	AFQYHSKEQQCV	IMAENRKSSII	IRMRDVVLFEK	KVYLSECKTGN	GKNYRGTMSKT	KNGITCQKWS	SSTSPHRPR
8	63	-----	AFQYHSKDQQCV	VMAENSKTSP	IARMRDVVLFEK	RIVLSECKTGN	GKNYRGTTSKT	KSGVTCQKWS	VSSPHIPK
9	70	-----	AFQYHSKEQQCV	VMAENSKNTP	VFRMRDVILYEK	RIVLSECKTGN	GQTYRGTTAET	KSGVTCQKWS	SATSPHVPK
10	63	-----	AFQYHSKEPRCV	LLAENRKSSP	VMRMRDVILFEK	RIVLSECKTGT	RSYRGTTSKT	KNGVSCQKWS	SDTSPHIPK
11	63	-----	SFQYHSKEQQCV	IMAENSKTSSI	IRMRDVILFEK	RIVLSECKTG	IGNSYRGTMS	RTEKSGVACQ	KWGATFPHVFN
12	63	-----	SFQYHSKEQQCV	IMAENSKTSSI	IRMRDVILFEK	RIVLSECKTG	IGKGYRGTMS	KTKTGVTCQ	KWSDTSPHVPK
13	63	-----	SFQYHSKEQQCV	IMAENSKTPV	LFRMRDVILFEK	KMYLSECKV	GNGKYRGTV	SKTKTGLTCQ	KWSAETPHKPR
14	63	-----	SFQYHSKEQQCV	VMAENSKSSA	IIRRRDVVLFEK	RMVYLSECKI	GNRSYRGTK	SKTKTGFTCQ	KWSSSYPHKPN
15	74	CNSD	GKAFQYHSKE	QQCVIMAENR	KSSIIIRMRDV	VLFKRVYLSE	CKTGNKNYR	GTMSKTKNG	ITCQKWSSTSPHRPR
16	5	-----	SFEYHSKEQQCA	IMAENSKSSA	VFRMRDVILFQ	KRIVLSECKT	GNGKTYRGT	MSKTKNGVAC	QKWSDTFPHKPN

FIGURA 2/3

		121	131	141	151	161	171	181	191																																																																								
1	137	F	S	P	A	T	H	P	S	E	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	P	Q	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	E	K	R	Y	D	Y	C	D	I	L	E	C	E	E	E	C	M	H	C	S	G	E	N	Y	D	G	K	I	S	K	T	M	S	G	L	E	C	Q	A	W	D	S	Q	S	P	H	A
2	137	Y	T	P	E	K	H	P	L	E	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	E	N	G	P	W	C	Y	T	T	N	D	V	R	F	D	Y	C	N	I	P	E	C	E	E	E	C	M	H	C	S	G	E	N	Y	E	G	K	I	S	K	T	K	S	G	L	E	C	Q	A	W	N	S	O	T	P	H	A	
3	137	F	S	P	A	T	H	P	S	E	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	P	Q	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	E	K	R	Y	D	Y	C	D	I	L	E	C	E	E	E	C	M	H	C	S	G	E	N	Y	D	G	K	I	S	K	T	M	S	G	L	E	C	Q	A	W	D	S	Q	S	P	H	A
4	137	F	S	P	A	T	H	P	S	E	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	P	Q	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	E	K	R	Y	D	Y	C	D	I	L	E	C	E	E	E	C	M	H	C	S	G	E	N	Y	D	G	K	I	S	K	T	M	S	G	L	E	C	Q	A	W	D	S	Q	S	P	H	A
5	127	F	S	P	A	T	H	P	S	E	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	P	Q	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	E	K	R	Y	D	Y	C	D	I	L	E	C	E	E	E	C	M	H	C	S	G	E	N	Y	D	G	K	I	S	K	T	M	S	G	L	E	C	Q	A	W	D	S	Q	S	P	H	A
6	137	F	S	P	A	T	H	P	S	E	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	G	Q	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	E	E	R	F	D	Y	C	D	I	P	E	C	E	D	E	C	M	H	C	S	G	E	N	Y	D	G	K	I	S	K	T	M	S	G	L	E	C	Q	A	W	D	S	Q	S	P	H	A
7	137	F	S	P	A	T	H	P	S	E	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	A	Q	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	E	H	R	Y	D	Y	C	D	I	P	E	C	E	E	A	C	M	H	C	S	G	E	N	Y	D	G	K	I	S	K	T	M	S	G	L	E	C	Q	A	W	D	S	Q	S	P	H	A
8	137	Y	S	P	E	K	F	P	L	A	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	E	R	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	E	T	R	F	D	Y	C	D	I	P	E	C	E	D	E	C	M	H	C	S	G	E	H	Y	E	G	K	I	S	K	T	M	S	G	L	E	C	Q	S	W	G	S	Q	S	P	H	A
9	144	F	S	P	E	K	F	P	L	A	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	E	N	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	D	K	R	Y	D	Y	C	D	I	P	E	C	E	D	K	C	M	H	C	S	G	E	N	Y	E	G	K	I	A	K	T	M	S	G	R	D	C	Q	A	W	D	S	Q	S	P	H	A
10	137	Y	S	P	D	K	N	P	S	E	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	E	K	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	G	T	R	F	D	Y	C	D	I	P	E	C	E	D	E	C	M	H	C	S	G	E	N	Y	E	G	K	I	S	K	T	I	S	G	L	E	C	Q	P	W	A	S	Q	S	P	H	A
11	137	Y	S	P	S	T	H	P	S	E	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	E	Q	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	D	K	R	Y	D	Y	C	N	I	P	E	C	E	E	E	C	M	Y	C	S	G	E	K	Y	E	G	K	I	S	K	T	M	S	G	L	D	C	Q	A	W	D	S	Q	S	P	H	A
12	137	Y	S	P	S	T	H	P	S	E	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	E	Q	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	D	Q	R	Y	E	Y	C	N	I	P	E	C	E	E	E	C	M	Y	C	S	G	E	K	Y	E	G	K	I	S	K	T	M	S	G	L	D	C	Q	S	W	D	S	Q	S	P	H	A
13	137	F	S	P	D	E	N	P	S	E	G	L	D	Q	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	P	K	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	E	V	R	Y	E	Y	C	S	I	I	Q	C	E	D	E	C	M	H	C	S	G	Q	N	Y	V	G	K	I	S	R	T	M	S	G	L	E	C	Q	P	W	D	S	O	I	P	H	P
14	137	F	T	E	K	K	Y	P	A	E	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	E	Q	G	P	W	C	Y	T	T	N	D	E	R	F	D	Y	C	D	I	P	E	C	E	D	E	C	M	H	C	S	G	E	N	Y	E	G	K	I	S	K	T	M	S	G	L	E	C	Q	A	W	D	S	Q	S	P	H	A	
15	154	F	S	P	A	T	H	P	S	E	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	P	Q	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	E	K	R	Y	D	Y	C	D	I	L	E	C	E	E	E	C	M	H	C	S	G	E	N	Y	D	G	K	I	S	K	T	M	S	G	L	E	C	Q	A	W	D	S	Q	S	P	H	A
16	79	Y	T	P	E	K	H	P	L	E	G	L	E	E	N	Y	C	R	N	P	D	N	D	E	R	G	P	W	C	Y	T	T	D	P	N	Q	R	F	D	Y	C	S	I	P	Q	C	E	D	E	C	M	H	C	S	G	E	N	Y	E	G	K	V	S	K	T	K	S	L	E	C	Q	A	W	N	S	O	T	P	H	A	

FIGURA 2/4

		201	211	221	231	241	251	261	271
1	217	HGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPDRELRPWCFTTDPNKRWELCDI	PRCTT	PPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTC					
2	217	HGYIPSKFPSKNLKMNYCRNPDGEPWPWCFTMDPNKRWEFCDI	PRCTT	PPPSGPTYQCLKGRGESYRGKVS	VTVSGHTC				
3	217	HGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPDGELRPWCFTTDPNKRWELCDI	PRCTT	PPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTC					
4	217	HGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPDGELRPWCFTTDPNKRWELCDI	PRCTT	PPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTC					
5	207	HGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPDGELRPWCFTTDPNKRWELCDI	PRCTT	PPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTC					
6	217	HGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPDGEPWPWCFTTDPNKRWELCDI	PRCTT	PPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTC					
7	217	HGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPDGEPWPWCFTTDPNKRWELCDI	PRCTT	PPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTC					
8	217	HGYLPSKFPNKNLKMNYCRNPDGEPWPWCFTTDPNKRWEFCDI	PRCTT	PPPSGPTYQCLKGRGENYRGTVSVTASGHTC					
9	224	HGYIPSKFPSKNLKMNYCRNPDGEPWPWCFTTDPNKRWEFCDI	PRCTT	PPSSGPTYQCLKGTGKNGYGGTVAVTESGHTC					
10	217	HGYIPSKFPNKNLKMNYCRNPDGEPWPWCFTTDPNKRWEFCDI	PRCST	PPPSGPTYQCLKGRGENYRGRVSVTQSGLTC					
11	217	HGYIPAKFPSKNLKMNYCRNPDGEPWPWCFTTDPNKRWEFCDI	PRCTT	PPPSGPTYQCLKGRGENYRGTVSVTVSGKTC					
12	217	HGYIPAKFPSKNLKMNYCRNPDGEPWPWCFTTDPNKRWEFCDI	PRCTT	PPPPGPTYQCLKGRGENYRGTVSVTASGHTC					
13	217	HGYIPSKFPSKNLKMNYCRNPDGEPWPWCFTMDRNKRWEFCDI	PRCTT	PPPSGPTYQCLMNGENHYQGNVAVTVSGLTC					
14	217	HGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPDGEPWPWCFTMDPNKRWELCDI	PRCTT	PPPSGPTHQCLKGRGESYRGKVARTKSGLTC					
15	234	HGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPDGELRPWCFTTDPNKRWELCDI	PRCTT	PPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTC					
16	159	HGYIPSKFPNKNLKMNYCRNPDGEPWPWCFTMDPNKRWEFCDI	PRCTT	PPPSGPTYQCLKGRGENYRGTVSVTASGHTC					

FIGURA 2/5

		281	291	301	311	321	331	341	351
1	297	QHWSAQT	PHTHNRT	PENFPCKNLDEN	YCRNPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSPVSTEQ	LAPTA--PPE-LTPV			
2	297	QHWSEQT	PHKHNRT	PENFPCKNLDEN	YCRNPDGETAPWCYTTNSEVVRWEHCQIPSC	ESSPITTEYLLDAPASV	PPE-QTPV		
3	297	QHWSAQT	PHTHNRT	PENFPCKNLDEN	YCRNPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSLVSTEQ	LAPTA--PPE-LTPV			
4	297	QHWSAQT	PHTHNRT	PENFPCKNLDEN	YCRNPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSLVSTEQ	LAPTA--PPE-LTPV			
5	287	QHWSAQT	PHTHNRT	PENFPCKNLDEN	YCRNPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSLVSTEQ	LAPTA--PPE-LTPV			
6	297	HGWSAQT	PHTHNRT	PENFPCKNLDEN	YCRNPDGEKAPWCYTTNSQVRWEYCKIPSC	ESSPVSTELDPTA--PPE-LTPV			
7	297	QRWSAQT	PQTHNRT	PENFPCKNLDEN	YCRNPDGEKAPWCYTTNSQVRWEYCKIPSC	GSSPVSTEQLDPTA--PPE-LTPV			
8	297	QRWSAQS	PFKHNRT	PENFPCKNLEEN	YCRNPDGETAPWCYTTDSEVRWDYCKIPSC	GSSPTSTEYLDAPV--PPE-QTPV			
9	304	QRWSEQT	PHKHNRT	PENFPCKNLEEN	YCRNPDGEKAPWCYTTNSKVRWEYCTIPSC	ESSPLSTERMDVPV--PPE-QTPV			
10	297	QRWSEQT	PHKHNRT	PENFPCKNLDEN	YCRNPDGETAPWCYTTSSSETRWEYCNIPSC	TSSVPTETDASE--PPE-QTPV			
11	297	QRWSEQT	PHRHNRT	PENFPCKNLEEN	YCRNPDGETAPWCYTTDSQLRWEYCEIPSC	ESSASPDQ--SDSSVPEEQTFV			
12	297	QRWSEQT	PHRHNRT	PENFPCKNLEEN	YCRNPDGETAPWCYTTDSQLRWEYCEIPSC	GSSVSPDQ--SDSSVLE-QTPV			
13	297	QRWGEQS	PHRHDRTPEN	YPCKNLDEN	YCRNPDGEFAPWCFTTNSVVRWEFC	KIPDCVSSASETEHSDAPVIVPPE-QTPV			
14	297	QRWSEQT	PHLHNRT	PENFPCKDLDEN	YCRNPDGESAPWCYTTDSKVRWEHCDIPSC	ASSFTSVEPLDAPA--PPE-ETPV			
15	314	QHWSAQT	PHTHNRT	PENFPCKNLDEN	YCRNPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSLVSTEQ	LAPTA--PPE-LTPV			
16	239	QRWSEQT	PHKHNRT	PENFPCKNLDEN	YCRNPDGESAPWCYTTDSEVRWEHCSI	PSCSSPLTLDLDTFASIPPE-QTPV			

FIGURA 2/6

		361	371	381	391	401	411	421	431
1	374	VQDCYHGDGQSYRGTSS	TTTTGKKCQSWSSMT	PHRHQKTPENY	PNAGLTMNYCRNPDAD-	KGPWCFTT	DPSVRWEYCNLK		
2	376	VQECYHNGGQSYRGTSS	TTITGRKCCQSWSSMT	PHRHEKTPPEH	FPEAGLTMNYCRNPDAD-	KSPWCYTT	DPSVRWEFCNLR		
3	374	VQDCYHGDGQSYRGTSS	TTTTGKKCQSWSSMT	PHRHQKTEENY	PNAGLTMNYCRNPDAD-	KGPWCFTT	DPSVRWEYCNLK		
4	374	VQDCYHGDGQSYRGTSS	TTTTGKKCQSWSSMT	PHRHQKTPENY	PNAGLTMNYCRNPDAD-	KGPWCFTT	DPSVRWEYCNLK		
5	364	VQDCYHGDGQSYRGTSS	TTTTGKKCQSWSSMT	PHRHQKTPENY	PNAGLTMNYCRNPDAD-	KGPWCFTT	DPSVRWEYCNLK		
6	374	VQECYHGDGQSYRGTSS	TTTTGKKCQSWSSMT	PHWHEKTPENF	PNAGLTMNYCRNPDAD-	KGPWCFTT	DPSVRWEYCNLK		
7	374	VQDCYHGDGQSYRGTSS	TTTTGKKCQSWSSMT	PHWHQKTPENY	PDAGLTMNYCRNPDAD-	KGPWCFTT	DPSVRWEYCNLK		
8	374	AQDCYRNGESYRGTSS	TTITGRKCCQSWVSM	TPHRHEKTPGNF	PNAGLTMNYCRNPDAD-	KSPWCYTT	DPRVRWEYCNLK		
9	381	PQDCYHNGGQSYRGTSS	TTITGRKCCQSWSSMT	PHRHLKTPENY	PNAGLTMNYCRNPDAD-	KSPWCYTT	DPRVRWEFCNLR		
10	374	VQDCYQDKGESYRGTSS	ITVTGKKCQSWSSMT	PHWHQKTPKYP	PNADLTMNYCRNPDGD-	KGPWCYTT	DPSVRWEFCNLR		
11	374	VQECYQSDGQSYRGTSS	TTITGKKCQSWAAMF	PHRHSKTPENF	PDAGLEMNYCRNPDGD-	KGPWCYTT	DPSVRWEYCNLK		
12	373	VQECYQNGKSYRGTSS	TTNTGKKCQSWVSM	TPHSHSKTPANF	PDAGLEMNYCRNPDND	QRGPWCFTT	DPSVRWEYCNLK		
13	376	VQECYQNGGQSYRGTSS	TTITGKKCQFWTSM	PHRHSKTPENY	PDADLTMNYCRNPDGD-	KGPWCYTT	DPSVRWEFCNLR		
14	374	VQECYQNGGQSYRGTSS	TTITGRKCCQSWLSM	TPHRHQKTPQNY	PNADLTMNYCRNPDGD-	IRPWCYTT	DPSVRWEYCNLR		
15	391	VQDCYHGDGQSYRGTSS	TTTTGKKCQSWSSMT	PHRHQKTPENY	PNAGLTMNYCRNPDAD-	KGPWCFTT	DPSVRWEYCNLK		
16	318	VQECYQNGGQSYRGTSS	TTITGKKCQPWSSM	SPHRHEKTPERE	PNAGLTMNYCRNPDGD-	KSPWCYTT	DPSVRWEFCNLR		

FIGURA 2/7

			441	451	461	471	481	491	501	511
1	453	KCSGTEASVVA-PPPVVLLFDVETPSEEDCMFGNGKGYRGKRATTVTGTPCQDWAAQEPHRHSIFTPETNPRA-GLEKNY								
2	455	KCLDPEASATN-SPAVPQVPSGQEPASDCMFGNGKGYRGKRATTVMGI PCQEWAAQEPHRHSIFTPETNPQA-GLEKNY								
3	453	KCSGTEASVVA-PPPVVQLPNVETPSEEDCMFGNGKGYRGKRATTVTGTPCQDWAAQEPHRHSIFTPETNPRA-GLEKNY								
4	453	KCSGTEASVVA-PPPVVQLPNVETPSEEDCMFGNGKGYRGKRATTVTGTPCQDWAAQEPHRHSIFTPETNPRA-GLEKNY								
5	443	KCSGTEASVVA-PPPVVQLPNVETPSEEDCMFGNGKGYRGKRATTVTGTPCQDWAAQEPHRHSIFTPETNPRA-GLEKNY								
6	453	KCSGTEGSVVA-PPPVAQLPDAETPSEEDCMFGNGKGYRGKRATTVTGTPCQEWAAQEPHSHRIFTPETNPRA-GLEKNY								
7	453	KCSGTEGSVVA-PPPVVQLPNVETPSEEDCMFGNGKGYRGKRATTVTGTPCQEWAAQEPHRHSIFTPQTNPRA-GLEKNY								
8	453	KCSETEQVVTN-FPAIAQVPSVEDLSE-DCMFGNGKRYRGKRATTVAGVPCQEWAAQEPHRHSIFTPETNPRA-GLEKNY								
9	460	KCSETPEQV---PAAQAPGVENFPEADCMIGMGKSYRGKRATTVAGVPCQEWAAQEPHRHSIFTPETNPQS-GLEKNY								
10	453	RCSETQQSFSNSPTDTQVPSVQEPSEPDCLGIGKGYOGKKATTVTGTRCOAWAAQEPHRHSIFTPANPWA-NLEKNY								
11	453	RCSETGGSVVE-LPTVSQEPSPSDSETDCMYGNGKDYRGKTAFTAAGTPCQGWAAQEPHRHSIFTPQTNPRA-GLEKNY								
12	453	RCSETGGGVAE-SAIVFQVPSAPGTSETDCMYGNGKEYRGKTAFTAAGTPCQEWAAQEPHSHRIFTPQTNPRA-GLEKNY								
13	455	KCSGTEMSATN-SSPV-QVSSASESSEQDCIIDNGKGYRGKATTGAGTPCQAWAAQEPHRHSIFTPETNPRA-DLOENY								
14	453	RCSEPAASPA-TVPTAQLPRPEATFEPDCMFGNGKGYRGKRATTADGTPCQGWAAQEPHRHNIETPETNPRA-GLEKNY								
15	470	KCSGTEASVVA-PPPVVQLPNVETPSEEDCMFGNGKGYRGKRATTVTGTPCQDWAAQEPHRHSIFTPETNPRA-GLEKNY								
16	397	KCLDTEESGTS-SPTVQVPSGEEPSETDCMFGNGKGYRGKRATTVLGI PCQEWAAQEPHSHRIFTPETNPRAEHLCP								
17	1	-----I RLDCMFGNGKRYRGKRATTVTGTPCQEWAAQEPHSHRIFTPETYPRA-GLEKNY								
18	1	-----APOAPSVENPPEADCLGIGKGYRGKRATTVAGVPCQEWAAQEPHRHGIFTPETNPRA-GLEKNY								

FIGURA 2/8

			521	531	541	551	561	571
1	531	CRNPDG-----	DVGGPWCYTTNPRKLYDYCDVPCAA-PSFDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVAHPSWFWQ					
2	533	CRNPDG-----	DVNGPWCYTMNQRKLFDYCDVPCVTSFDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVANPHSWFWQ					
3	531	CRNPDG-----	DVGGPWCYTTNPRKLYDYCDVPCAS-PSFDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVAHPSWFWQ					
4	531	CRNPDG-----	DVGGPWCYTTNPRKLYDYCDVPCAS-PSFDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVAHPSWFWQ					
5	521	CRNPDG-----	DVGGPWCYTTNPRKLYDYCDVPCAS-PSFDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVAHPSWFWQ					
6	531	CRNPDG-----	DVGGPWCYTTNPRKLFDYCDVPCAA-SSFDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVAYPSWFWQ					
7	531	CRNPDG-----	DEGGPWCYTTNPRKHYDYCDVPCAS-SSFDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVANAHSWFWQ					
8	530	CRNPDG-----	DDNGPWCYTTNPQKLFDYCDVPCVTSFDCGKPKQVEPKKCPARVVGGCVSI PHSWFWQ					
9	535	CRNPDG-----	DVNGPWCYTMNPRKLFDYCDVPC-E-SSFDCGKPKQVEPKKCSGRIVGGCVSKPHSWFWQ					
10	532	CRNPDG-----	DVNGPWCYTMNPQKLFDYCDVPCES-SPFDCGKPKQVEPKKCSGRIVGGCVAIASWFWQ					
11	531	CRNPDG-----	DVNGPWCYTTNPRKLYDYCDIPLCASASSFDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVANPHSWFWQ					
12	531	CRNPDG-----	DVNGPWCYTMNPRKLYDYCDIPLCASLSSFDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVANPHSWFWQ					
13	532	CRNPDG-----	DANGPWCYTTNPRKLFDYCDIPLCVSPSSADCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVANPHSWFWQ					
14	531	CRNPDG-----	DTNGPWCYTMNPRKLYDYCDVPCASSSYDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVANPHSWFWQ					
15	548	CRNPDG-----	DVGGPWCYTTNPRKLYDYCDVPCAS-PSFDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVAHPSWFWQ					
16	476	CLVPSVPTVFFFFFFFFFLFLDVNGPWCYTTNPRKLFDYCDIPLCAS-GSEDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVANPHSWFWQ						
17	55	CRNPDG-----	DVGGPWCYTTNPRKLYDYCDVPCAS-SSFDCGKPKQVEPKKCPGRVVGGCVAAHPSWFWQ					
18	65	CRNPDG-----	DVNGPWCYTTNPRKLFDYCDIPLC-E-SSFDCGKPKQVEPKKCPARVVGGCVATPHSWFWQ					

FIGURA 2/9

		581		591		601		611		621		631		641
1	596	VSLRTRF-GM-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAAHCL	ERSRPR	SSYKVI	LGAHQE	VNLEPH	VQIEIE	VSRLF	FLEPTR	KDIAL	L
2	598	ISLRTRY-GK-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAAHCL	ERSRPR	ASYKVI	LGAHQE	VNLESD	VQIEIE	VYKLF	FLEPTR	ADIAL	L
3	596	VSLRTRL-GM-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAAHCL	ERSRPR	SSYKVI	LGAHQE	VKLEPH	VQIEIE	VSRLF	FLEPTR	TDIAL	L
4	596	VSLRTSS-NIAGKYWHFCGGT	LISPEWV	LTAAHCL	ERSRPR	SSYKVI	LGAHQE	VKLEPH	VQIEIE	VSRLF	FLEPTR	TDIAL	L	
5	586	VSLRTRL-GM-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAAHCL	ERSRPR	SSYKVI	LGAHQE	VKLEPH	VQIEIE	VSRLF	FLEPTR	TDIAL	L
6	596	ISLRTRL-GM-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAAHCL	ERSRPR	FYKVI	LGAHQE	VNLEPH	VQIEIE	VSKMF	SEPAR	ADIAL	L
7	596	VSLRTRF-GT-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAAHCL	ERSRPR	SSYKVI	LGAHQE	VNLEPH	VQIEIE	VSRLF	FLEPTR	ADIAL	L
8	595	ISLRHRY-GG-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAHCL	ERSRPR	SSYKVI	LGAHQE	YHVG	EVQIEI	DVSKL	FKREP	SEADIAL	L
9	599	VSLR-RS-SR-----	HFCGGT	LISPKWV	LTAAHCL	DNILAL	SFYKVI	LGAHQE	VREQSV	QIEIPV	SRLF	FRFPS	QADIAL	L
10	597	ISLRTRF-GR-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAAHCL	ERSRPR	STYKVI	LGAHQE	VNLEPH	VQIEIE	VSKLF	FLEPSR	ADIAL	L
11	597	ISLRTRFTGQ-----	HFCGGT	LIAPEWV	LTAAHCL	ERSRPR	FYKVI	LGAHQE	YIRGSD	VQIEIS	VAKLI	LEPNR	ADIAL	L
12	597	ISLRTRFSGQ-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAAHCL	ERSRPR	FYKVI	LGAHQE	ERTLGS	DVQI	AVTKI	VLEPN	DADIAL	L
13	598	VSLR-RF-GQ-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAAHCL	EKFSNP	AIYKVI	LGAHQE	TRLERD	VQIKG	VTMFL	EPRADIAL	L	
14	597	ISLRTRT-GQ-----	HFCGGT	LIAPEWV	LTAAHCL	EYPRPS	AYRVIL	LGAHQE	VNLELD	VQDID	VAKL	FLEPSR	ADIAL	M
15	613	VSLRTRL-GM-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAAHCL	ERSRPR	SSYKVI	LGAHQE	VKLEPH	VQIEIE	VSRLF	FLEPTR	TDIAL	L
16	555	ISLRTRF-GQ-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAAHCL	ERSRPR	AAAYKVI	LGAHQE	VNLESD	VQIEIE	VSKLF	FLEPTH	ADIAL	L
17	120	VSLRTRF-GM-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAAHCL	ERSRPR	FYKVI	LGAHQE	VNLEPH	VQIEIE	VSKMF	SEPAR	ADIAL	L
18	129	VSLRRRS-RE-----	HFCGGT	LISPEWV	LTAHCL	DSILG	PSFYTV	LGAHQE	YEMARE	ASVQIEI	PVSRLF	FLEPSR	ADIAL	L

FIGURA 2/10

	651	661	671	681	691	701	711	721
1	670	KLSSPAVITDKVIPACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGT	FGAGLLKEAQLPVIENKVCNRYEFLNGRVQSTEL					
2	672	KLSSPAVITSKVIPACLPPPNYVVADRTL	LCYITGWGETQGT	YGAGLLKEAQLPVIENKVCNRYEYLNGRVKSTEL				
3	670	KLSSPAIITDKVIPACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGT	FGAGLLKEAQLPVIENKVCNRYEFLNGRVKSTEL					
4	675	KLSSPAIITDKVIPACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGT	FGAGLLKEAQLPVIENKVCNRYEFLNGRVKSTEL					
5	660	KLSSPAIITDKVIPACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGT	FGAGLLKEAQLPVIENKVCNRYEFLNGRVKSTEL					
6	670	KLSSPAIITDKVIPACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGT	YGAGLLKEARLPVIENKVCNRYEFLNGTVKTTTEL					
7	670	KLSSPAVITDKVIPACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGT	FGAGLLKEAQLPVIENKVCNRYEFLNGRVKSTEL					
8	669	KLSSPAIITDKVIPACLPTPNYVVADR	TACYITGWGETKGT	YGAGLLKEARLPVIENKVCNRYEYLGKGVSPNEL				
9	672	KLSPAIITKKEVIPACLPPPNYVVAARTECYITGWGETQGT	PGEGLLKEAHL	PVIENKVCNRYEYLDGRVKFTTEL				
10	671	KLSSPAIITQNVIPACLPPADYVVANWAE	CFVTGWGETQDSSNAGV	LKEAQLPVIENKVCNRYEYLNGRVKSTEL				
11	672	KLSPATITDKVIPACLPSPNYVADR	TICYITGWGETQGT	FGAGRLKEAQLPVIENKVCNRYEYLNNRVKSTEL				
12	672	KLSPATITDNVIPACLPSPNYVADR	TLCYITGWGETKGT	FGAGRLKEAQLPVIENKVCNRYEYLNNRVKSTEL				
13	671	KLSSPAIITDKIIPACLPSNYMVADR	SLCYITGWGETKGT	YGAGLLKEAQLPVIENKVCNRYEYLLNGRVKSTEL				
14	671	KLSSL-----	EWAWTYGAGLLKEAQLPVIENKVCNRYEYLLNGRVKSTEL					
15	687	KLSSPAIITDKVIPACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGT	FGAGLLKEAQLPVIENKVCNRYEFLNGRVKSTEL					
16	629	KLQSPAVLTSKVIPACLPSPNYVVADR	TLCYITGWGETQGT	FGVLLKEAQLPVIENKVCNRYEYLLNGRVKSTEL				
17	194	KLSSPAIITDKVIPACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGT	YGAGLLKEARLPVIENKVCNRYEFLNGRVKSTEL					
18	203	KLSSPAVITDEVIPACLPSPNYVVADK	TVCYITGWGETQGT	FGVRLKEARLPVIENKVCNRYEYLLNGRVKSTEL				

FIGURA 2/11

		731	741	751	761	771	781	791	
1	745	CAGHLAGGT	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVTWIEGVMRNN	810
2	747	CAGNLAGGT	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVTWIEGIMRNN	812
3	745	CAGHLAGGT	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVTWIEGVMRNN	810
4	750	CAGHLAGGT	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVTWIEGVMRNN	815
5	735	CAGHLAGGT	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVTWIEGVMRNN	800
6	745	CAGHLAGGT	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVTWIEGVMRNN	810
7	745	CAGHLAGGT	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVTWIEGVMRNN	810
8	744	CAGHLAGGI	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCALPNKPGVYVRVSRFVTWIEEIMRNN	809	
9	747	CAGHLIGGT	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSPYVPWIEETMRNN	812
10	746	CAGHLVGGV	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSSFINWIERIMQSN	811
11	747	CAGQLAGGV	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVDWIEREMRNN	812
12	747	CAGHLAGGI	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVNWIEREMRND	812
13	746	CAGHLAGGV	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	RYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVSWLQDVMRNN	811
14	715	CAGHLAGGT	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVDWIERIMRNN	780
15	762	CAGHLAGGT	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVTWIEGVMRNN	827
16	704	CAGNLAGGT	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVTWIEEIMRNN	769
17	269	CAGHLAGGT	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSRFVTWIEGVMRNN	334
18	278	CAGDLAGGT	DSCQGDSGGPLVC	FEKD	KYI	LQGV	TSWGLGCARP	NKPGVYVRVSTYVPWIEETMRRY	343

FIGURA 2/12

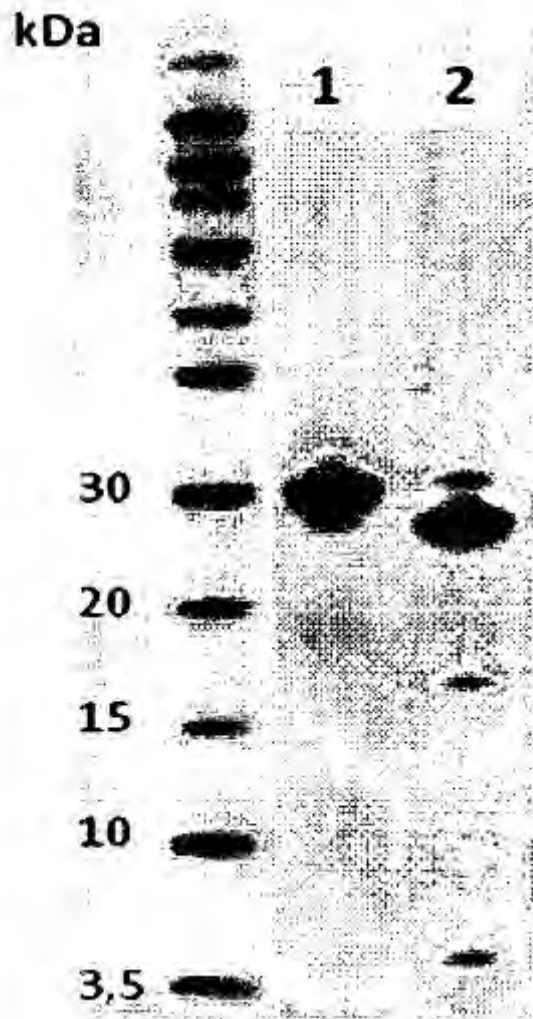


FIGURA 3