

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 066**

51 Int. Cl.:

C07K 1/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2011** **PCT/US2011/037774**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011** **WO11149962**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2011** **E 11787264 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018** **EP 2576587**

54 Título: **Proteínas NGAL mutantes y usos de las mismas**

30 Prioridad:

15.06.2010 US 354973 P
24.05.2010 US 347587 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2018

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN
THE CITY OF NEW YORK (100.0%)
412 Low Memorial Library 535 West 116th Street
New York, New York 10027, US**

72 Inventor/es:

**BARASCH, JONATHAN y
QIU, ANDONG**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 667 066 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

Proteínas NGAL mutantes y usos de las mismas

5 Antecedentes

NGAL (lipocalina 2) es una proteína pequeña con un peso molecular de aproximadamente 22 kD. NGAL se une a sideróforos de unión a hierro, tales como enteroquelina, con alta afinidad y por tanto quela y produce una circulación de hierro. Una vez producida en células, NGAL se secreta al espacio extracelular y se transporta al riñón donde
 10 pasa la barrera de filtración del glomérulo y entra en la orina primaria. Sin embargo, NGAL se reabsorbe entonces eficazmente por receptores de megalina localizados en el lado apical de los epitelios de los túbulos proximales. Una vez que la NGAL se reabsorbe y se somete a endocitosis, circula a los lisosomas y se degrada. Una vez degradada, cualquier hierro que transportara la NGAL al riñón se reabsorbe.

15 Sumario de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el desarrollo de versiones mutantes de la proteína NGAL que no se reabsorben en el riñón y, por tanto, a diferencia de NGAL de tipo natural, se excretan en cantidades significativas en la orina. Como NGAL de tipo natural, estas formas mutantes de NGAL tienen la capacidad de unirse a sideróforos de
 20 unión a hierro, tales como enteroquelina. Por tanto, estos mutantes de NGAL pueden usarse para la circulación de hierro fuera del cuerpo facilitando su excreción en la orina. Como tales, las proteínas NGAL mutantes de la invención pueden usarse en el tratamiento de sobrecarga de hierro y enfermedades y trastornos asociados con sobrecarga de hierro. Además, las proteínas NGAL mutantes de la invención tienen actividad bacteriostática y pueden usarse para tratar infecciones bacterianas de las vías urinarias. Estos y otros aspectos de la presente invención se describen en
 25 más detalle a continuación, y en otras secciones de esta solicitud.

En una realización la presente invención proporciona una proteína NGAL mutante que comprende SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 en la que la proteína NGAL mutante (a) puede unirse a un sideróforo, y (b) se excreta en la orina.

En algunas realizaciones el % de la proteína NGAL mutante que se acumula en la orina tras la administración sistémica de la proteína NGAL mutante a un sujeto es mayor que el % de proteína NGAL WT que se acumula en la orina tras la administración sistémica de proteína NGAL WT a un sujeto. En algunas realizaciones el % de la proteína NGAL mutante que se acumula en la orina tras la administración sistémica de la proteína NGAL mutante a
 35 un sujeto es mayor de 10 veces o mayor de 100 veces más que el % de proteína NGAL WT que se acumula en la orina tras la administración sistémica de proteína NGAL WT a un sujeto. En una realización el % de la proteína NGAL mutante que se acumula en la orina tres horas tras la administración sistémica de la proteína NGAL mutante a un sujeto es del 1% o más, o el 2% o más, o el 5% o más, o el 10% o más, o el 20% o más. Esto es significativamente superior al % de proteína NGAL WT que se acumula en la orina, normalmente sólo
 40 aproximadamente el 0,1% de NGAL WT que se administra a un sujeto se acumula de manera sistémica en la orina a lo largo del mismo periodo de tiempo.

En algunas realizaciones la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína NGAL mutante. En algunas realizaciones la presente invención proporciona un vector de expresión que
 45 comprende una secuencia de ácido nucleico de este tipo operativamente unida a un promotor. La presente invención también proporciona células bacterianas y células de mamífero que expresan de manera estable tales ácidos nucleicos y que pueden ser útiles para la producción de proteínas NGAL mutantes recombinantes.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas NGAL mutantes de la invención y composiciones farmacéuticas que comprenden complejos de tales proteínas NGAL mutantes junto con un sideróforo, tal como enteroquelina, pirogalol, carboximicobactina, catecol o variantes de los mismos.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas NGAL mutantes de la invención para su uso en el tratamiento de sobrecarga de hierro en un sujeto que lo necesita.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas NGAL mutantes de la invención para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas de las vías urinarias en un sujeto que lo necesita.

Estas y otras realizaciones de la invención se describen adicionalmente en las siguientes secciones de la solicitud, incluyendo la descripción detallada, los ejemplos, las reivindicaciones y los dibujos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Alineación de proteína Ngal de ser humano (*HsNgal*; NP_005555 - NGAL humana WT - SEQ ID NO: 1),

ratón (*MmNgal*; NP_032517, SEQ ID NO: 17), rata (*RnNgal*; NP_570097, SEQ ID NO: 18), chimpancé (*PtNgal*, XP_001153985, SEQ ID NO: 14), bovino (*BtNgal*; XP_605012; SEQ ID NO: 16), perro (*CtNgal*; SEQ ID NO: 12), jabalí (*SsNgal*; SEQ ID NO: 13), mono rhesus (*MamNgal*, SEQ ID NO: 15) y caballo (*Equus caballus* (*Ec*) NGAL, SEQ ID NO: 11). La secuencia de proteína NGAL humana está en negrita, y los residuos de aminoácido sobre la superficie de proteínas NGAL están subrayados. Δ y ◇ indican los residuos cargados positivamente conservados y no conservados (arginina [R], lisina [K] e histidina [H]) sobre la superficie de proteína Ngal funcional, respectivamente. Magenta: residuos cargados positivamente; azul: residuos cargados negativamente; rojo: residuos apolares e hidrófobos; verde: residuos polares e hidrófilos.

Figura 2. Comparación de proteínas megalina de ser humano (SEQ ID NO: 19) y ratón (SEQ ID NO: 20). Las secuencias de las proteínas megalina de ser humano y ratón se alinearon usando ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>), y se mostró que compartían el 76% de identidad y el 87% de similitud, respectivamente.

Figura 3. Examen de mutantes de NGAL que presentan acumulación específica en orina. (A). Los mutantes de NGAL se unen a enteroquelina (Ent) y $^{55}\text{Fe}^{3+}$ formando un complejo. Se mezcló la proteína mutante Apo NGAL (4 nmol) con $^{55}\text{Fe}^{3+}$ y Ent de igual cantidad molar, y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos. Entonces se lavó la mezcla durante 4 x 5 minutos en una columna de filtro con un punto de corte de 10K, y se calculó Ent- $^{55}\text{Fe}^{3+}$ unido a NGAL como porcentaje de $^{55}\text{Fe}^{3+}$ total de partida. B-D. El complejo NGAL-Ent- $^{55}\text{Fe}^{3+}$ preparado se inyectó por vía intraperitoneal en ratones (hembra, 4 semanas), y se recogió la orina (B) durante 3 horas en una jaula metabólica. Se disecaron el hígado (C) y los riñones (D) y se solubilizaron en NaOH 1 M y SDS al 2% para el examen de la acumulación de $^{55}\text{Fe}^{3+}$, expresada como un porcentaje del complejo NGAL-Ent- $^{55}\text{Fe}^{3+}$ total.

Figura 4. Comparación de las estructuras de NGAL de tipo natural y la proteína NGAL mutante K3. (A). Se usó la estructura cristalina de proteína NGAL de tipo natural (número de registro: 1nglA.pdb) para predecir la estructura tridimensional de la proteína mutante K3 usando Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org>). Se predice que la organización del bolsillo de unión a Ent-hierro en la proteína K3 es muy similar al de en NGAL de tipo natural. (B). La proteína mutante K3 tiene menos residuos cargados positivamente (arginina, lisina o histidina) sobre su superficie en comparación con NGAL de tipo natural según la estructura tridimensional modelada. Se muestran los residuos cargados positivamente como moléculas de esferas y barras, y el color amarillo indica la superficie accesible al disolvente de la proteína NGAL.

Figura 5. Porcentaje de recuperación de $^{55}\text{Fe}^{3+}$ tras la inyección de proteínas mutantes NGAL complejadas con enteroquelina y $^{55}\text{Fe}^{3+}$. Se calculó la cantidad de Ent- $^{55}\text{Fe}^{3+}$ unido a NGAL como porcentaje del $^{55}\text{Fe}^{3+}$ total de partida. Se muestra la recuperación en la orina, el riñón, el pulmón, el bazo, el hígado y el corazón. D1 es SEQ ID NO: 32; B1 es SEQ ID NO: 24; K1 es SEQ ID NO: 7; K2 es SEQ ID NO: 3; K3 es SEQ ID NO: 2; K5 es SEQ ID NO: 6; 15 es SEQ ID NO: 45.

Figura 6. (A), izquierda: Enteroquelina:Fe. El sideróforo esencial de organismos Gram-negativos. Se compone de tres grupos catecol unidos entre sí por una estructura principal. El hierro (rojo) se une con una afinidad de 10-49 M. (B), derecha: Enteroquelina:Fe unido dentro del cáliz de la proteína Ngal con una afinidad de 0,4 nM. Los mutantes K1 - K8 representan los mutantes D1-4, D1-4-1, D1-4-2-1, d1-4-2-1-1, d1-4-2-1-3, d1-4-2-1-4, WT-3 y D1-4-2 para los que se proporcionan las secuencias en el presente documento.

Figura 7. Aclaramiento de Ngal mediante el túbulo proximal. Se introdujo FI-Ngal en el peritoneo, y tras 1 hora se recogió el riñón. Se localizó Ngal en lisosomas del túbulo proximal. Los mutantes K1 - K8 representan los mutantes D1-4, D1-4-1, D1-4-2-1, d1-4-2-1-1, d1-4-2-1-3, d1-4-2-1-4, WT-3 y D1-4-2 para los que se proporcionan las secuencias en el presente documento.

Figura 8. Mientras que las transferencias de carga de ligando-metal entre Ent y Fe^{3+} ($\text{Imax} = 498 \text{ nm}$) no se modificaron mediante la adición de proteína Ngal (obsérvese la coloración roja en los 2 tubos a la izquierda), catecol: Fe^{3+} se convertía de un complejo de FeL (azul, $\text{Imax} = 575 \text{ nm}$) a un complejo de FeL3 (rojo, $\text{Imax} = 498 \text{ nm}$) cuando se unía a Ngal (tubos de la derecha) y produjo un espectro idéntico a Ent:Fe.

Figura 9. Se visualizó mediante autorradiografía la circulación de ^{55}Fe unido a Ngal a través del suero hasta el riñón. Obsérvese los granos de plata negros en los túbulos proximales pero no en nefronas distales tras la introducción de Ngal:Ent: ^{55}Fe o Ngal:catecol: ^{55}Fe . Los mutantes K1 - K8 representan los mutantes D1-4, D1-4-1, D1-4-2-1, d1-4-2-1-1, d1-4-2-1-3, d1-4-2-1-4, WT-3 y D1-4-2 para los que se proporcionan las secuencias en el presente documento.

Figura 10. Se recogió orina de ratones tanto de tipo natural como con delección de megalina. Se detectó Ngal mediante inmunotransferencia usando anticuerpos policlonales anti-Ngal de ratón. Los mutantes K1 - K8 representan los mutantes D1-4, D1-4-1, D1-4-2-1, d1-4-2-1-1, d1-4-2-1-3, d1-4-2-1-4, WT-3 y D1-4-2 para los que se proporcionan las secuencias en el presente documento.

Figura 11. Biopsia de riñón humano para detectar AKI teñido con anticuerpos anti-Ngal. Obsérvese la asociación de

NGAL con la cápsula de Bowman y con los endosomas apicales del túbulo proximal (tinción de color rojo-marrón). Los mutantes K1 - K8 representan los mutantes D1-4, D1-4-1, D1-4-2-1, d1-4-2-1-1, d1-4-2-1-3, d1-4-2-1-4, WT-3 y D1-4-2 para los que se proporcionan las secuencias en el presente documento.

Figura 12. Liberación de ligandos de Ngal como resultado de la acidificación. El pH bajo liberó 55Fe de complejos Ngal:catecol:FeIII pero no de Ngal:Ent:FeIII. La carga de FeIII a pH 7,0 se definió como el 100% del ensayo. El catecol difería significativamente de Ent ($P=0,00012$). Los mutantes K1 - K8 representan los mutantes D1-4, D1-4-1, D1-4-2-1, d1-4-2-1-1, d1-4-2-1-3, d1-4-2-1-4, WT-3 y D1-4-2 para los que se proporcionan las secuencias en el presente documento.

Figura 13. Parte superior: Inmunodetección de orina mediante inmunotransferencia de tipo Western de Ngal wt y mutante en la orina 3 h tras la inyección i.p. (80 mg). Parte del medio: El material de partida muestra la inmunotransferencia de proteínas NGAL WT y mutantes (100 ng) y la parte inferior SDS-Page y tinción de Coomassie. Los mutantes K1 - K8 representan los mutantes D1-4, D1-4-1, D1-4-2-1, d1-4-2-1-1, d1-4-2-1-3, d1-4-2-1-4, WT-3 y D1-4-2.

Figura 14. Actividad de retención de 55Fe3+ de Ngal:Ent de tipo natural y mutante. Los mutantes K1 - K8 representan los mutantes D1-4, D1-4-1, D1-4-2-1, d1-4-2-1-1, d1-4-2-1-3, d1-4-2-1-4, WT-3 y D1-4-2.

Figura 15. Determinación de la afinidad de sideróforo:hierro en complejo con Ngal de tipo natural. (A) Análisis de extinción de fluorescencia de Ngal con sideróforos ("L") (B) o Ngal con FeIII-sideróforos ("FeL3"). Obsérvese que FeIII potencia drásticamente la afinidad de Ngal por diferentes catecoles. 2,3DHBA= Ent. Los mutantes K1 - K8 representan los mutantes D1-4, D1-4-1, D1-4-2-1, d1-4-2-1-1, d1-4-2-1-3, d1-4-2-1-4, WT-3 y D1-4-2 para los que se proporcionan las secuencias en el presente documento.

Figura 16. Análisis de 55Fe3+ que se suministró mediante Ngal:Ent de tipo natural o mutante a orina de ratón. En esta figura K1 - K8 representan los mutantes D1-4, D1-4-1, D1-4-2-1, d1-4-2-1-1, d1-4-2-1-3, d1-4-2-1-4, WT-3 y D1-4-2.

Figura 17. Ngal quela eficazmente FeIII. Se detectó conversión de HPF en fluoresceína (ex. 490 nm, em. 515 nm) en presencia de catecol, hierroIII y H2O2 (línea negra), pero la adición de Ngal bloqueó esta reacción (línea gris); $P<10^{-5}$. Los mutantes K1 - K8 representan los mutantes D1-4, D1-4-1, D1-4-2-1, d1-4-2-1-1, d1-4-2-1-3, d1-4-2-1-4, WT-3 y D1-4-2 para los que se proporcionan las secuencias en el presente documento.

Figura 18. El mutante de Ngal K3 inhibe la actividad redox del hierro. Se detectaron radicales oxidativos producidos por Fe(III), catecol y H2O2 mediante una sonda fluorescente, 3'-(p-hidroxifenil)fluoresceína (HPF), y la producción de los radicales oxidativos se inhibió completamente por proteínas Ngal de tipo natural (WT) y K3.

Figura 19. Muestra la alineación de aminoácidos y secuencias de NGAL WT (SEQ ID NO: 1) y mutante de NGAL K3 (SEQ ID NO: 2).

Figura 20. El tubo de la izquierda muestra que NGAL se une a catecol:Fe encontrado en la orina, generando un color rojo brillante. El tubo contiene la forma mutante K3 de NGAL que puede sortear el túbulo proximal y suministrar hierro o Apo-NGAL a la orina. Tubo de la derecha: Apo-Ngal. Estos datos muestran que la NGAL mutante K3 puede unirse a sideróforos tales como Ent:Fe y por tanto se predice que transporta hierro desde la sangre a la orina.

Descripción detallada

La presente invención se basa, en parte, en el desarrollo de versiones mutantes de la proteína NGAL que no se reabsorben en el riñón y, por tanto, a diferencia de NGAL de tipo natural, se excretan en la orina. Estas formas mutantes de NGAL tienen la capacidad de unirse a sideróforos de unión a hierro, tales como enteroquelina, y pueden usarse para la circulación de hierro fuera del cuerpo mediante excreción en la orina. Como tales, las proteínas NGAL mutantes de la invención pueden usarse en el tratamiento de sobrecarga de hierro y enfermedades y trastornos asociados con sobrecarga de hierro. Además, las proteínas NGAL mutantes de la invención tienen actividad bacteriostática y pueden usarse para tratar infecciones de las vías urinarias. Por tanto, la presente invención proporciona proteínas NGAL mutantes, composiciones farmacéuticas que comprenden tales proteínas NGAL mutantes, o bien solas o bien complejadas con sideróforos, y el uso de tales proteínas NGAL mutantes y composiciones en el tratamiento de diversos trastornos y enfermedades, tales como en el tratamiento de trastornos asociados con sobrecarga de hierro y en el tratamiento de infecciones bacterianas de las vías urinarias. Estos y otros aspectos de la presente invención se describen más completamente a continuación, y también en otras secciones de esta solicitud.

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

La abreviatura "NGAL" se refiere a lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (*Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin*). NGAL también se denomina en la técnica lipocalina de neutrófilos humana, siderocalina, proteína

relacionada con a-microglobulina, Scn-NGAL, lipocalina 2, 24p3, proteína superinducible 24 (SIP24), uterocalina y lipocalina relacionada con neu. Estos nombres alternativos para NGAL pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento. A menos que se establezca otra cosa, el término “NGAL”, tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier proteína NGAL, fragmento o mutante. En algunas realizaciones la proteína NGAL es

La abreviatura hNGAL se refiere a NGAL humana.

La abreviatura “WT” se refiere a tipo natural, tal como una secuencia de aminoácidos o nucleótidos de tipo natural.

Tal como se usa en el presente documento el término “aproximadamente” se usa en el presente documento queriendo decir de manera aproximada, más o menos, alrededor o en la región de. Cuando se usa el término “aproximadamente” conjuntamente con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. En general, el término “aproximadamente” se usa en el presente documento para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido en una varianza del 20 por ciento arriba o abajo (superior o inferior).

NGAL

NGAL es una proteína pequeña con un peso molecular de aproximadamente 22 kD y es una proteína de unión a sideróforos. Un sideróforo es una molécula orgánica que se une a y quela hierro. Las bacterias producen el sideróforo enteroquelina, y los mamíferos expresan de manera endógena una molécula de tipo similar, pero más sencilla, denominada catecol. La enteroquelina tiene una afinidad extremadamente alta por el hierro, y NGAL de tipo natural tiene una alta afinidad por el complejo de enteroquelina-hierro. El complejo de enteroquelina-hierro-NGAL es insensible al pH y el hierro unido es inactivo redox. Por tanto el hierro unido a tales complejos de NGAL no está disponible para catalizar la formación de radicales de oxígeno, haciendo que NGAL sea un quelante de hierro ideal para su uso *in vivo*.

NGAL, y una vez producida en las células, se secreta al espacio extracelular y se aclara rápidamente por el riñón con una semivida de 10 minutos. Los niveles en suero y orina de la proteína pueden llegar a ser muy altos en varios modelos de enfermedad. La proteína NGAL se transporta al riñón de seres humanos sanos y puede pasar la barrera de filtración de los glomérulos (el tamaño de corte de la filtración es de aproximadamente 70 kD) entrando en la orina primaria, pero luego se reabsorbe eficazmente NGAL mediante receptores megalina o megalina-cubilina-cubilina localizados en el lado apical de los epitelios de los túbulos proximales. La megalina es un receptor universal con amplia especificidad de sustrato y se expresa en la superficie apical de los túbulos proximales del riñón en donde está implicada en la reabsorción de proteínas. La unión de la megalina a sus sustratos está mediada por interacciones iónicas, y sus dominios de unión a sustrato cargados negativamente pueden unirse eficazmente a las superficies cargadas positivamente de proteínas en el filtrado urinario. Una vez absorbida y sometida a endocitosis, NGAL circula a los lisosomas, en donde se degrada. Una vez degradada, se reabsorbe el hierro que transporta NGAL al riñón.

MUTANTES DE NGAL

La presente invención proporciona proteínas NGAL mutantes, incluyendo, pero sin limitarse a, las que se han mutado para eliminar residuos cargados positivamente que pueden estar implicados en la interacción con megalina. Como NGAL WT, los mutantes de NGAL de la invención tienen alta afinidad por complejos enteroquelina-hierro pero parecen tener una afinidad significativamente reducida por megalina (tabla 1). Por tanto, en vez de reabsorberse mediante un mecanismo mediado por receptor megalina en el riñón, los mutantes de NGAL de la invención, y complejos de estos mutantes con enteroquelina y hierro, no se reabsorben eficazmente en el riñón y en su lugar se excretan en la orina. Las proteínas NGAL mutantes de la invención pueden usarse por tanto para eliminar eficazmente el hierro excesivo del cuerpo y que circule a la orina en una forma inactiva redox segura. Además, informes previos han mostrado que NGAL-enteroquelina-hierro tiene poca o ninguna toxicidad química o celular, sugiriendo que podría usarse de manera segura terapéuticamente, por ejemplo en el tratamiento terapéutico de enfermedades y trastornos asociados con sobrecarga de hierro, tales como hemocromatosis.

Los términos “proteína NGAL mutante” y “mutante de NGAL” tal como se usan en el presente documento, se refieren a una proteína o una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de NGAL humana WT (SEQ ID NO. 1, véase la secuencia de HsNGAL en la figura 1).

Se dan a conocer proteínas NGAL mutantes que pueden tener uno o más cambios “no conservativos”, en las que un aminoácido dado se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales o químicas diferentes. En varias realizaciones se mutan residuos de lisina, arginina y/o histidina básicos/cargados positivamente sobre la superficie de la proteína NGAL, tales como los que interaccionan con megalina, sustituyendo estos residuos con residuos no básicos/no cargados positivamente. Estos son cambios no conservativos. Por ejemplo, en varias realizaciones, se sustituyen residuos de lisina (Lys - K), arginina (Arg - R) y/o histidina (His - H) básicos/cargados positivamente, tales como aquellos sobre la superficie de la proteína NGAL que pueden estar implicados en la

interacción con megalina, por residuos no básicos/no cargados positivamente tales como alanina (Ala - A), asparagina (Asn - N), ácido aspártico (Asp - D), cisteína (Cys - C), glutamina (Gln - Q), ácido glutámico (Glu - E), glicina (Gly - G), isoleucina (Ile - I), leucina (Leu - L), metionina (Met - M), fenilalanina (Phe - F), prolina (Pro - P), serina (Ser - S), treonina (Thr - T), triptófano (Trp - W), tirosina (Tyr - Y) y valina (Val - V). En algunas realizaciones, se sustituyen residuos de lisina, arginina y/o histidina básicos/cargados positivamente por residuos cargados negativamente tales como ácido aspártico (Asp - D) y ácido glutámico (Glu - E).

En algunas realizaciones las proteínas NGAL mutantes pueden tener uno o más cambios “conservativos”, en los que un aminoácido dado se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales o químicas similares. Por ejemplo, en algunas realizaciones es deseable o bien dejar los residuos de NGAL que están implicados en la interacción con el sideróforo intactos o bien realizar sólo cambios conservativos en esos residuos. Pueden hacerse otras diversas sustituciones de aminoácidos conservativas en toda la proteína NGAL, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas que no destruyen la capacidad de los mutantes de NGAL para transportar hierro fuera del cuerpo. Un tipo de sustitución de aminoácido conservativa se refiere a la capacidad de intercambio de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos de sustitución conservativa de aminoácidos útiles son: valina leucina isoleucina, fenilalanina tirosina, lisina arginina, alanina valina, y asparagina glutamina.

Las proteínas NGAL mutantes pueden contener diversas mutaciones (incluyendo adiciones, deleciones y sustituciones) además de las mutaciones de residuos específicos expuestas en el presente documento (a continuación), incluyendo, por ejemplo, adiciones en o deleciones de los extremos N- y/o C-terminales de los mutantes de NGAL. Cualquiera de tales mutaciones puede hacerse hasta el grado de que no afecte de manera adversa a la capacidad de los mutantes de NGAL para unirse a un sideróforo, para transportar hierro y/o para excretarse en la orina.

En realizaciones adicionales, los mutantes de NGAL pueden comprender uno o más aminoácidos que no se producen de manera natural. Los aminoácidos no naturales, tales como los que contienen grupos funcionales de cadena lateral únicos incluyendo halógenos, hidrocarburos insaturados, heterociclos, silicio y unidades organometálicas, pueden ofrecer ventajas en la mejora de la estabilidad de las proteínas. Muchos de tales aminoácidos que no se producen de manera natural se conocen. Tales aminoácidos que no se producen de manera natural pueden usarse en los mutantes de NGAL dados a conocer en el presente documento.

En determinadas realizaciones, los mutantes de NGAL pueden tener un determinado % de identidad con respecto a NGAL humana WT o con respecto a algún otro mutante de NGAL. Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o secuencias de aminoácidos: “identidad de secuencia”, “porcentaje de identidad de secuencia” e “identidad”. Estos términos se usan según su significado habitual en la técnica. El porcentaje de identidad de secuencia se mide con referencia a una secuencia de referencia. El término “identidad de secuencia” significa que dos secuencias de polinucleótidos o de aminoácidos son idénticas (es decir, en una base de nucleótido a nucleótido). El término “porcentaje de identidad de secuencia” se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas, determinando el número de posiciones en las que aparece el aminoácido o base de ácido nucleico idéntico en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones, y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Trece residuos de superficie positivos no conservados en NGAL

La proteína NGAL contiene trece residuos de aminoácido de superficie básicos/positivos que no están conservados entre las especies, concretamente los residuos Lys 15, Lys 46, Lys 50, Lys 59, Lys 62, Lys 73, Lys 74, Lys 75, Lys 98, His 118, Arg 130, Lys 149 e His 165. Los datos presentados en la presente solicitud demuestran que las mutaciones de diversas combinaciones de estos trece residuos de aminoácido da como resultado la generación de mutantes de NGAL que, como NGAL WT, tienen la capacidad de unirse a enteroquelina-hierro pero, a diferencia de NGAL WT, no se reabsorben eficazmente en el riñón. Tales mutantes de NGAL, cuando se complejan con un sideróforo tal como enteroquelina, pueden usarse para transportar el hierro en exceso fuera del cuerpo facilitando su excreción en la orina. Tales mutantes de NGAL pueden tener también actividad bacteriostática y pueden usarse para tratar infecciones bacterianas de las vías urinarias.

Se dan a conocer proteínas NGAL mutantes que comprenden, consisten en o consisten esencialmente en secuencias de aminoácidos que se basan en la secuencia de aminoácidos de NGAL humana WT, o un fragmento de la misma, pero que contienen una o más mutaciones. En una realización, se da a conocer un mutante de NGAL que tiene, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o las trece de las siguientes posiciones de aminoácido mutadas en comparación con NGAL humana WT: Lys 15, Lys 46, Lys 50, Lys 59, Lys 62, Lys 73, Lys

74, Lys 75, Lys 98, His 118, Arg 130, Lys 149 e His 165. En algunas realizaciones cinco o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones seis o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones siete o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones ocho o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones nueve o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones diez o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT.

En una realización los residuos de aminoácido mutados se delecionan. En otra realización los residuos de aminoácido mutados se sustituyen por un aminoácido no cargado positivamente (es decir, una sustitución no conservativa). En otra realización los residuos de aminoácido mutados se sustituyen por un aminoácido cargado negativamente (es decir una sustitución no conservativa). En otra realización el mutante de NGAL puede comprender cualquier combinación de tales mutaciones, es decir puede estar presente cualquier combinación de delecciones, sustituciones para aminoácidos no cargados positivamente, o sustituciones para aminoácidos cargados negativamente en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce cualesquiera o los trece de los residuos de aminoácido enumerados anteriormente. En realizaciones preferidas tales mutantes de NGAL no están mutados (es decir, tienen la misma secuencia de aminoácidos que NGAL humana WT), en uno o más, o más preferiblemente todos, de los siguientes residuos de aminoácido que están implicados en la interacción NGAL-enteroquelina: asparagina 39, alanina 40, tirosina 52, serina 68, triptófano 79, arginina 81, tirosina 100, tirosina 106, fenilalanina 123, lisina 125, tirosina 132, fenilalanina 133 y lisina 134, o si están mutados en estos residuos sólo se realizan sustituciones conservativas.

En una realización preferida se da a conocer un mutante de NGAL en el que se sustituye Lys (K) 15 por un aminoácido no cargado, incluyendo, pero sin limitarse a, Ser (S). En una realización preferida se da a conocer un mutante de NGAL en el que se sustituye Lys (K) 46 por un aminoácido cargado negativamente, incluyendo, pero sin limitarse a, Glu (E). En una realización preferida se da a conocer un mutante de NGAL en el que se sustituye Lys (K) 50 por un aminoácido no cargado, incluyendo, pero sin limitarse a, Thr (T). En una realización preferida se da a conocer un mutante de NGAL en el que se sustituye Lys (K) 59 por un aminoácido no cargado, incluyendo, pero sin limitarse a, Gln (Q). En una realización preferida se da a conocer un mutante de NGAL en el que se sustituye Lys (K) 62 por un aminoácido no cargado, incluyendo, pero sin limitarse a, Gly (G). En una realización preferida se da a conocer un mutante de NGAL en el que se sustituye Lys (K) 73 por un aminoácido cargado negativamente, incluyendo, pero sin limitarse a, Asp (D). En una realización preferida se da a conocer un mutante de NGAL en el que se sustituye Lys (K) 74 por un aminoácido cargado negativamente, incluyendo, pero sin limitarse a, Asp (D). En una realización preferida se da a conocer un mutante de NGAL en el que se sustituye Lys (K) 75 por un aminoácido alifático, incluyendo, pero sin limitarse a, Gly (G). En una realización preferida la presente invención proporciona un mutante de NGAL en el que se sustituye Lys (K) 98 por un aminoácido no cargado, incluyendo, pero sin limitarse a, Gln (Q). En una realización preferida se da a conocer un mutante de NGAL en el que se sustituye His (H) 118 por un aminoácido apolar, incluyendo, pero sin limitarse a, Phe (F). En una realización preferida se da a conocer un mutante de NGAL en el que se sustituye Arg (R) 130 por un aminoácido no cargado, incluyendo, pero sin limitarse a, Gln (Q). En una realización preferida se da a conocer un mutante de NGAL en el que se sustituye Lys (K) 149 por un aminoácido no cargado, incluyendo, pero sin limitarse a, Gln (Q). En una realización preferida se da a conocer un mutante de NGAL en el que se sustituye His (H) 165 por un aminoácido no cargado, incluyendo, pero sin limitarse a, Asn (N).

Se da a conocer un mutante de NGAL que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70%, o al menos el 75%, o al menos el 80%, o al menos el 85%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 98% idéntica a la secuencia de NGAL humana WT (SEQ ID NO. 1), o un fragmento de la misma, en el que uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o los trece residuos de entre Lys 15, Lys 46, Lys 50, Lys 59, Lys 62, Lys 73, Lys 74, Lys 75, Lys 98, His 118, Arg 130, Lys 149 e His 165 se delecionan o se sustituyen por un aminoácido no cargado positivamente, tal como un aminoácido cargado negativamente, y en el que el mutante de NGAL: (a) se excreta en la orina o presenta un mayor nivel de excreción en la orina que NGAL humana WT, y/o (b) no se reabsorbe en el túbulo proximal del riñón o presenta un nivel de reabsorción inferior en el túbulo proximal del riñón en comparación con NGAL humana WT, y/o (c) no es un sustrato para la reabsorción en el riñón mediante un mecanismo mediado por receptor megalina-cubilina-cubilina, y/o (d) tiene afinidad reducida por el receptor megalina-cubilina en comparación con NGAL humana WT, y/o (e) tiene menos residuos cargados positivamente sobre su superficie accesible al disolvente en comparación con NGAL humana WT, y en el que el mutante de NGAL también (i) puede unirse a un sideróforo, y/o (ii) puede unirse a un sideróforo complejoado con hierro, y/o (iii) tiene una estructura tridimensional conservada del bolsillo de unión a enteroquelina y/o (iv) tiene actividad bacteriostática. En algunas realizaciones cinco o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones seis o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones siete o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones ocho o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones nueve o más de las trece posiciones de

aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones diez o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En realizaciones preferidas tales mutantes de NGAL no están mutados (es decir, tienen la misma secuencia de aminoácidos que NGAL humana WT), en uno o más, o más preferiblemente todos, de los siguientes residuos de aminoácido que están implicados en la interacción NGAL-enteroquelina: asparagina 39, alanina 40, tirosina 52, serina 68, triptófano 79, arginina 81, tirosina 100, tirosina 106, fenilalanina 123, lisina 125, tirosina 132, fenilalanina 133 y lisina 134, o si están mutados en estos residuos sólo se realizan sustituciones conservativas.

Los mutantes de NGAL de la invención incluyen los que comprenden la secuencia de mutantes K2, K3, I1 e I3 (véase la tabla 2).

En una realización, la presente invención proporciona un mutante de NGAL que comprende la secuencia del mutante de NGAL K3 (SEQ ID NO. 2), en el que los residuos 15, 46, 73, 74, 75, 98, 118, 130, 149 y 165 difieren cada uno de la secuencia de NGAL humana WT y son cada uno aminoácidos no cargados positivamente, y en el que el mutante de NGAL: (a) se excreta en la orina o presenta un mayor nivel de excreción en la orina que NGAL humana WT, y/o (b) no se reabsorbe en el túbulo proximal del riñón o presenta un nivel de reabsorción inferior en el túbulo proximal del riñón en comparación con NGAL humana WT, y/o (c) no es un sustrato para la reabsorción en el riñón mediante un mecanismo mediado por receptor megalina-cubilina, y/o (d) tiene afinidad reducida por el receptor megalina-cubilina en comparación con NGAL WT, y/o (e) tiene menos residuos cargados positivamente sobre su superficie accesible al disolvente en comparación con NGAL humana WT, y en el que el mutante de NGAL también (i) puede unirse a un sideróforo, y/o (ii) puede unirse a un sideróforo complejoado con hierro, y/o (iii) tiene una estructura tridimensional conservada del bolsillo de unión a enteroquelina y/o (iv) tiene actividad bacteriostática. En algunas realizaciones cinco o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones seis o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones siete o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones ocho o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones nueve o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones diez o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En realizaciones preferidas tales mutantes de NGAL no están mutados (es decir, tienen la misma secuencia de aminoácidos que NGAL humana WT), en uno o más, o más preferiblemente todos, de los siguientes residuos de aminoácido que están implicados en la interacción NGAL-enteroquelina: asparagina 39, alanina 40, tirosina 52, serina 68, triptófano 79, arginina 81, tirosina 100, tirosina 106, fenilalanina 123, lisina 125, tirosina 132, fenilalanina 133 y lisina 134, o si están mutados en estos residuos sólo se realizan sustituciones conservativas.

En otra realización, la presente invención proporciona un mutante de NGAL que comprende la secuencia del mutante de NGAL K2 (SEQ ID NO. 3), en el que los residuos 15, 73, 74, 75, 98, 118, 130, 149 y 165 difieren cada uno de la secuencia de NGAL humana WT y son cada uno aminoácidos no cargados positivamente, y en el que el mutante de NGAL: (a) se excreta en la orina o presenta un mayor nivel de excreción en la orina que NGAL humana WT, y/o (b) no se reabsorbe en el túbulo proximal del riñón o presenta un nivel de reabsorción inferior en el túbulo proximal del riñón en comparación con NGAL humana WT, y/o (c) no es un sustrato para la reabsorción en el riñón mediante un mecanismo mediado por receptor megalina-cubilina-cubilina, y/o (d) tiene afinidad reducida por el receptor megalina-cubilina-cubilina en comparación con NGAL WT, y/o (e) tiene menos residuos cargados positivamente sobre su superficie accesible al disolvente en comparación con NGAL humana WT, y en el que el mutante de NGAL también (i) puede unirse a un sideróforo, y/o (ii) puede unirse a un sideróforo complejoado con hierro, y/o (iii) tiene una estructura tridimensional conservada del bolsillo de unión a enteroquelina y/o (iv) tiene actividad bacteriostática. En algunas realizaciones cinco o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones seis o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones siete o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones ocho o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones nueve o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones diez o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En realizaciones preferidas tales mutantes de NGAL no están mutados (es decir, tienen la misma secuencia de aminoácidos que NGAL humana WT), en uno o más, o más preferiblemente todos, de los siguientes residuos de aminoácido que están implicados en la interacción NGAL-enteroquelina: asparagina 39, alanina 40, tirosina 52, serina 68, triptófano 79, arginina 81, tirosina 100, tirosina 106, fenilalanina 123, lisina 125, tirosina 132, fenilalanina 133 y lisina 134, o si están mutados en estos residuos sólo se realizan sustituciones conservativas.

En otra realización, la presente invención proporciona un mutante de NGAL que comprende la secuencia del mutante de NGAL I3 (SEQ ID NO. 4), en el que los residuos 62, 73, 74, 75 y 98 difieren cada uno de la secuencia de NGAL humana WT y son cada uno aminoácidos no cargados positivamente, y en el que el mutante de NGAL: (a) se excreta en la orina o presenta un mayor nivel de excreción en la orina que NGAL humana WT, y/o (b) no se reabsorbe en el túbulo proximal del riñón o presenta un nivel de reabsorción inferior en el túbulo proximal del riñón

en comparación con NGAL humana WT, y/o (c) no es un sustrato para la reabsorción en el riñón mediante un mecanismo mediado por receptor megalina-cubilina-cubilina, y/o (d) tiene afinidad reducida por el receptor megalina-cubilina-cubilina en comparación con NGAL WT, y/o (e) tiene menos residuos cargados positivamente sobre su superficie accesible al disolvente en comparación con NGAL humana WT, y en el que el mutante de NGAL también (i) puede unirse a un sideróforo, y/o (ii) puede unirse a un sideróforo complejo con hierro, y/o (iii) tiene una estructura tridimensional conservada del bolsillo de unión a enteroquelina y/o (iv) tiene actividad bacteriostática. En algunas realizaciones cinco o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones seis o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones siete o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones ocho o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones nueve o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones diez o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En realizaciones preferidas tales mutantes de NGAL no están mutados (es decir, tienen la misma secuencia de aminoácidos que NGAL humana WT), en uno o más, o más preferiblemente todos, de los siguientes residuos de aminoácido que están implicados en la interacción NGAL-enteroquelina: asparagina 39, alanina 40, tirosina 52, serina 68, triptófano 79, arginina 81, tirosina 100, tirosina 106, fenilalanina 123, lisina 125, tirosina 132, fenilalanina 133 y lisina 134, o si están mutados en estos residuos sólo se realizan sustituciones conservativas.

En otra realización, la presente invención proporciona un mutante de NGAL que comprende la secuencia del mutante de NGAL I1 (SEQ ID NO. 5), en el que los residuos 15, 73, 74, 75 y 130 difieren cada uno de la secuencia de NGAL humana WT y son cada uno aminoácidos no cargados positivamente, y en el que el mutante de NGAL: (a) se excreta en la orina o presenta un mayor nivel de excreción en la orina que NGAL humana WT, y/o (b) no se reabsorbe en el túbulo proximal del riñón o presenta un nivel de reabsorción inferior en el túbulo proximal del riñón en comparación con NGAL humana WT, y/o (c) no es un sustrato para la reabsorción en el riñón mediante un mecanismo mediado por receptor megalina-cubilina, y/o (d) tiene afinidad reducida por el receptor megalina-cubilina en comparación con NGAL WT, y/o (e) tiene menos residuos cargados positivamente sobre su superficie accesible al disolvente en comparación con NGAL humana WT, y en el que el mutante de NGAL también (i) puede unirse a un sideróforo, y/o (ii) puede unirse a un sideróforo complejo con hierro, y/o (iii) tiene una estructura tridimensional conservada del bolsillo de unión a enteroquelina y/o (iv) tiene actividad bacteriostática. En algunas realizaciones cinco o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones seis o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones siete o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones ocho o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones nueve o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En algunas realizaciones diez o más de las trece posiciones de aminoácido enumeradas están mutadas en comparación con NGAL humana WT. En realizaciones preferidas tales mutantes de NGAL no están mutados (es decir, tienen la misma secuencia de aminoácidos que NGAL humana WT), en uno o más, o más preferiblemente todos, de los siguientes residuos de aminoácido que están implicados en la interacción NGAL-enteroquelina: asparagina 39, alanina 40, tirosina 52, serina 68, triptófano 79, arginina 81, tirosina 100, tirosina 106, fenilalanina 123, lisina 125, tirosina 132, fenilalanina 133 y lisina 134, o si están mutados en estos residuos sólo se realizan sustituciones conservativas.

En realizaciones adicionales los mutantes de NGAL descritos anteriormente tienen mutaciones en uno o más de los trece residuos de superficie positivos/básicos no conservados, pueden tener también mutaciones en uno o más de los cinco residuos de superficie positivos/básicos conservados a continuación, o una o más de las otras mutaciones descritas en otras secciones posteriores de esta descripción detallada.

Cinco residuos de superficie positivos/básicos conservados en NGAL

La proteína NGAL contiene cinco residuos de aminoácido de superficie básicos/positivos que están conservados entre las especies ser humano, rata, ratón, chimpancé, vaca, perro, jabalí y mono rhesus, concretamente los residuos Arg(R) 43, Arg(R) 72, Arg(R) 140, Lys(K) 142, y Lys(K) 157. Se dan a conocer mutantes de NGAL que tienen una, dos, tres, cuatro o las cinco de estas posiciones de aminoácido mutadas en comparación con NGAL humana WT. En una realización el residuo o residuos de aminoácido mutados se delecionan. En otra realización el residuo o residuos de aminoácido mutados se sustituyen por un aminoácido no cargado positivamente (es decir, un cambio no conservativo). En otra realización el residuo o residuos de aminoácido mutados se sustituyen por un aminoácido cargado negativamente (es decir, un cambio no conservativo). En otra realización el mutante de NGAL puede comprender cualquier combinación de tales mutaciones, es decir puede proporcionarse cualquier combinación de delecciones, sustituciones por aminoácidos no cargados positivamente o sustituciones por aminoácidos cargados negativamente en uno, dos, tres, cuatro o cinco de los residuos de aminoácido enumerados anteriormente.

Se da a conocer un mutante de NGAL que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una secuencia de

- aminoácidos que es al menos el 70%, o al menos el 75%, o al menos el 80%, o al menos el 85%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 98% idéntica a la secuencia de NGAL humana WT (SEQ ID NO. 1), o un fragmento de la misma, en el que uno, dos, tres, cuatro o los cinco residuos de entre (R) 43, Arg(R) 72, Arg(R) 140, Lys(K) 142 y Lys(K) 157 se delecionan o se sustituyen por un aminoácido no cargado positivamente, tal como un aminoácido cargado negativamente, y en el que el mutante de NGAL: (a) se excreta en la orina o presenta un mayor nivel de excreción en la orina que NGAL humana WT, y/o (b) no se reabsorbe en el túbulo proximal del riñón o presenta un nivel de reabsorción inferior en el túbulo proximal del riñón en comparación con NGAL humana WT, y/o (c) no es un sustrato para la reabsorción en el riñón mediante un mecanismo mediado por receptor megalina-cubilina, y/o (d) tiene afinidad reducida por el receptor megalina-cubilina en comparación con NGAL WT, y/o (e) tiene menos residuos cargados positivamente sobre su superficie accesible al disolvente en comparación con NGAL humana WT, y en el que el mutante de NGAL también (i) puede unirse a un sideróforo, y/o (ii) puede unirse a un sideróforo complejoado con hierro, y/o (iii) tiene una estructura tridimensional conservada del bolsillo de unión a enteroquelina y/o (iv) tiene actividad bacteriostática. En realizaciones preferidas tales mutantes de NGAL no están mutados (es decir, tienen la misma secuencia de aminoácidos que NGAL humana WT), en uno o más, o más preferiblemente todos, de los siguientes residuos de aminoácido que están implicados en la interacción NGAL-enteroquelina: asparagina 39, alanina 40, tirosina 52, serina 68, triptófano 79, arginina 81, tirosina 100, tirosina 106, fenilalanina 123, lisina 125, tirosina 132, fenilalanina 133 y lisina 134, o si están mutados en estos residuos sólo se realizan sustituciones conservativas.
- En realizaciones adicionales los mutantes de NGAL descritos en esta sección que tienen mutaciones en uno o más de los cinco residuos de superficie positivos/básicos conservados, también pueden tener mutaciones en uno o más de los trece residuos de superficie positivos/básicos no conservados descritos en la sección previa de la Descripción detallada, o una o más de las otras mutaciones descritas en las siguientes secciones de esta Descripción detallada.
- Residuos de superficie adicionales en NGAL
- Los siguientes residuos de aminoácido están ubicados sobre la superficie de la proteína NGAL y pueden desempeñar un papel en la interacción de la proteína NGAL con la proteína megalina y/o en la reabsorción de NGAL en el riñón: residuos de aminoácido 1-15, 17-26, 40-50, 57-62, 71-82, 84-89, 96-105, 114-118, 128-131, 134, 140-151, 157-165 y 170-174.
- Se dan a conocer proteínas NGAL mutantes que comprenden, consisten en o consisten esencialmente en secuencias de aminoácidos que se basan en la secuencia de aminoácidos de NGAL humana, o un fragmento de la misma, pero que contienen mutaciones como en uno o más de los residuos de aminoácido individuales ubicados en los residuos 1-15, 17-26, 40-50, 57-62, 71-82, 84-89, 96-105, 114-118, 128-131, 134, 140-151, 157-165 y/o 170-174 de NGAL humana WT. En una realización uno o más de los residuos de aminoácido mutados puede delecionarse. En otra realización uno o más de los residuos de aminoácido mutados puede sustituirse por un aminoácido no cargado positivamente, incluyendo, pero sin limitarse a un aminoácido cargado negativamente. En otra realización el mutante de NGAL puede comprender cualquier combinación de tales mutaciones, es decir cualquier combinación de delecciones, sustituciones por aminoácidos no cargados positivamente y/o sustituciones por aminoácidos cargados negativamente en uno cualquiera o más de los residuos de aminoácido enumerados anteriormente. La tabla 2 proporciona detalles de todas las posibles mutaciones de los residuos de superficie de NGAL, incluyendo los que contempla la presente invención. En realizaciones preferidas tales mutantes de NGAL no están mutados (es decir, tienen la misma secuencia de aminoácidos que NGAL humana WT), en uno o más, o más preferiblemente todos, de los siguientes residuos de aminoácido que están implicados en la interacción NGAL-enteroquelina: asparagina 39, alanina 40, tirosina 52, serina 68, triptófano 79, arginina 81, tirosina 100, tirosina 106, fenilalanina 123, lisina 125, tirosina 132, fenilalanina 133 y lisina 134, o si están mutados en estos residuos sólo se realizan sustituciones conservativas.
- Se da a conocer un mutante de NGAL que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70%, o al menos el 75%, o al menos el 80%, o al menos el 85%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 98% idéntica a la secuencia de NGAL humana WT (SEQ ID NO. 1), o un fragmento de la misma, en el que uno o más de los residuos de aminoácido individuales ubicados en los residuos 1-15, 17-26, 40-50, 57-62, 71-82, 84-89, 96-105, 114-118, 128-131, 134, 140-151, 157-165 y/o 170-174 de NGAL humana WT se deleciona o se sustituye por un aminoácido no cargado positivamente, tal como un aminoácido cargado negativamente, y en el que el mutante de NGAL: (a) se excreta en la orina o presenta un mayor nivel de excreción en la orina que NGAL humana WT, y/o (b) no se reabsorbe en el túbulo proximal del riñón o presenta un nivel de reabsorción inferior en el túbulo proximal del riñón en comparación con NGAL humana WT, y/o (c) no es un sustrato para la reabsorción en el riñón mediante un mecanismo mediado por receptor megalina-cubilina, y/o (d) tiene afinidad reducida por el receptor megalina-cubilina en comparación con NGAL WT, y/o (e) tiene menos residuos cargados positivamente sobre su superficie accesible al disolvente en comparación con NGAL humana WT, y en el que el mutante de NGAL (i) puede unirse a un sideróforo, y/o (ii) puede unirse a un sideróforo complejoado con hierro, y/o (iii) tiene una estructura tridimensional conservada del bolsillo de unión a enteroquelina y/o (iv) tiene actividad bacteriostática. En realizaciones preferidas tales mutantes de NGAL no están mutados (es decir, tienen la misma secuencia de aminoácidos que NGAL humana WT), en uno o más, o más preferiblemente todos, de los siguientes residuos de aminoácido que están implicados en la interacción NGAL-enteroquelina: asparagina 39,

alanina 40, tirosina 52, serina 68, triptófano 79, arginina 81, tirosina 100, tirosina 106, fenilalanina 123, lisina 125, tirosina 132, fenilalanina 133 y lisina 134, o si están mutados en estos residuos sólo se realizan sustituciones conservativas.

5 PROPIEDADES FUNCIONALES DE MUTANTES DE NGAL

En determinadas realizaciones las proteínas NGAL mutantes de la invención tienen determinadas funciones especificadas. Por ejemplo, en algunas realizaciones las proteínas NGAL mutantes de la invención tienen una o más de las siguientes propiedades: (a) se excretan en la orina o presentan un mayor nivel de excreción en la orina que NGAL humana WT, y/o (b) no se reabsorben en el túbulo proximal del riñón o presentan un nivel de reabsorción menor en el túbulo proximal del riñón que NGAL humana WT, y/o (c) no son un sustrato para la reabsorción en el riñón mediante un mecanismo mediado por receptor megalina-cubilina. De manera similar, en algunas realizaciones las proteínas NGAL mutantes de la invención tienen una o más de las siguientes propiedades: (i) pueden unirse a sideróforos de tipo enteroquelina, y/o (ii) pueden unirse a sideróforos de tipo enteroquelina complejados con hierro, y/o (iii) tienen una estructura tridimensional conservada del bolsillo de unión a enteroquelina y/o (iv) tienen actividad bacteriostática.

Cada una de las propiedades anteriores de las proteínas NGAL mutantes de la invención pueden someterse a prueba y/o cuantificarse, y en algunas realizaciones las proteínas NGAL mutantes de la invención tienen propiedades funcionales que se encuentran dentro de un determinado intervalo numérico.

Por ejemplo, en algunas realizaciones las proteínas NGAL mutantes de la invención se excretan en la orina o presentan un mayor nivel de excreción en la orina que NGAL humana WT. La excreción de las proteínas NGAL mutantes de la invención puede detectarse y cuantificarse, por ejemplo usando los métodos descritos en la sección de ejemplos de esta solicitud. Por ejemplo la cantidad de la proteína NGAL mutante presente en la orina un tiempo dado tras administrarse a un sujeto, tal como un ratón o un sujeto humano, puede medirse y puede expresarse como un porcentaje de la cantidad total administrada (véanse los ejemplos y la tabla 1) para dar un % de acumulación en la orina. El % de acumulación en la orina de un mutante de NGAL dado puede compararse con el de otros mutantes o de NGAL WT. NGAL o un mutante de NGAL o complejo de sideróforo del mismo puede radiomarcarse (por ejemplo con hierro radiactivo) o marcarse con algún otro resto detectable con el fin de facilitar su detección y cuantificación. En algunas realizaciones la presente invención proporciona que las proteínas NGAL mutantes de la invención presentan un mayor nivel de excreción en la orina que NGAL humana WT. Por ejemplo, los mutantes de NGAL pueden tener un nivel de 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces o superior de excreción en la orina que NGAL humana WT. Tal como se observa en la figura 5, NGAL WT puede tener un % de acumulación en la orina (medido como un % de la cantidad administrada por vía intraperitoneal) de menos del 0,2%. En cambio, tal como puede observarse a partir de la figura 3, la figura 5 y la tabla 1, los mutantes de NGAL de la invención pueden tener un % de acumulación en la orina (medido como un % de la cantidad administrada por vía intraperitoneal 3 horas después de la administración) de más del 1%, o más del 2%, o más del 3%, o más del 4%, o más del 5%, o más del 6%, o más del 7%, o más del 8%, o más del 9%, o más del 10%, o más del 15%, o más del 20%, o más.

En algunas realizaciones las proteínas NGAL mutantes de la invención pueden unirse a sideróforos, tales como enteroquelina, y/o pueden unirse a sideróforos complejados con hierro. La capacidad de los mutantes de NGAL de la invención para unirse a sideróforos y complejos de sideróforo-hierro puede someterse a prueba y/o cuantificarse, por ejemplo usando los métodos descritos en la sección de ejemplos de esta solicitud. Por ejemplo NGAL (incluyendo los mutantes de NGAL de la invención) y moléculas de sideróforo tales como enteroquelina y hierro se asocian entre sí con una razón molar de 1:1:1 y NGAL (incluyendo los mutantes de NGAL de la invención) y moléculas de sideróforo tales como catecol y hierro se asocian entre sí con una razón molar de 1:3:1. Por consiguiente, usando una forma radiomarcada de hierro, puede medirse o estimarse la unión de NGAL a moléculas de sideróforo y hierro examinando el % de hierro radiomarcado que retiene una proteína NGAL dada. El % de hierro (hierro-sideróforo) que se retiene puede compararse entre mutantes de NGAL o entre un mutante de NGAL y NGAL WT. En algunas realizaciones la presente invención proporciona que las proteínas NGAL mutantes de la invención presentan un % similar de retención de hierro (hierro-sideróforo) en comparación con NGAL WT. En algunas realizaciones la presente invención proporciona que las proteínas NGAL mutantes de la invención presentan un % superior de retención de hierro (hierro-sideróforo) en comparación con NGAL WT, tal como un % 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces o más veces mayor de retención de hierro (hierro-sideróforo). En algunas realizaciones, las proteínas NGAL mutantes de la invención presentan un % de retención de hierro (hierro-sideróforo) de aproximadamente el 20% o más, o aproximadamente el 30% o más, o aproximadamente el 40% o más.

En algunas realizaciones las proteínas NGAL mutantes de la invención tienen actividad antibacteriana. La actividad antibacteriana de los mutantes de NGAL de la invención puede someterse a prueba y/o cuantificarse, por ejemplo usando metodologías convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo cultivando bacterias en presencia de los mutantes de NGAL y evaluando el efecto de los mutantes de NGAL sobre el crecimiento, la supervivencia, los números, etc. bacterianos en comparación con las condiciones de control en las que no está presente mutante de NGAL.

LIPOCALINAS DISTINTAS DE NGAL

Se dan a conocer mutantes de otras lipocalinas que, como los mutantes de NGAL descritos en el presente documento, tienen la capacidad de unirse a complejos de sideróforo-hierro pero no se reabsorben en el riñón. Se espera que tales mutantes de lipocalina puedan usarse de manera similar a los mutantes de NGAL descritos en el presente documento para la circulación de hierro fuera del cuerpo y puedan usarse por tanto en el tratamiento de trastornos de sobrecarga de hierro. Se espera también que tales mutantes de lipocalina puedan usarse también para tratar infecciones bacterianas de las vías urinarias.

Hay aproximadamente 20 proteínas conocidas en la familia de lipocalina. Cualquier proteína lipocalina, u homólogo, variante, derivado, fragmento o mutante de la misma, que se una a un complejo de sideróforo-hierro puede mutarse con el fin de proporcionar un mutante de lipocalina de la invención. Los ejemplos de lipocalinas que pueden usarse según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, proteína de unión a retinol, alérgeno de lipocalina, afrodísina, alfa-2-microglobulina, prostaglandina D sintasa, beta-lactoglobulina, proteína de unión a bilina, las nitroforinas, lipocalina 1, lipocalina 12 y lipocalina 13.

SIDERÓFOROS

Los sideróforos son compuestos de unión a hierro (por ejemplo Fe^{3+}) de alta afinidad. La gran mayoría de los sideróforos conocidos los producen bacterias. Las bacterias liberan sideróforos al entorno circundante con el fin de eliminar o quelar hierro y transportar el hierro a las bacterias -un proceso necesario para la supervivencia de las bacterias. Los sideróforos que se conocen en la técnica incluyen, pero no se limitan a enteroquelina, TRENCAM, MECAM, TRENCAM-3,2-HOPO, parabactina, carboximicobactina, fusígeno, triacetilfusarinina, ferricromo, coprógeno, ácido rodotorúlico, ornibactina, exoquelina, ferrioxamina, desferrioxamina B, aerobactina, ferricromo, rizoferina, pioquelina, pioverdina. Las estructuras de estos compuestos se dan a conocer en Holmes *et al.*, Structure, 2005, 13:29-41 y Flo *et al.*, Nature, 2004, 432: 917-921, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia.

Se sabe que varios de los sideróforos anteriores se unen a lipocalinas, incluyendo NGAL y se sabe que complejos de estos sideróforos y lipocalinas pueden secuestrar hierro (véanse por ejemplo, Holmes *et al.*, Structure, 2005, 13:29-41 y Flo *et al.*, Nature, 2004, 432: 917-921; Goetz *et al.*, Molecular Cell, 2002, 10: 1033-1043 y Mori, *et al.*, "Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury". J. Clin Invest., 2005, 115, 610-621). Las proteínas NGAL mutantes de la invención también pueden formar complejos con sideróforos y pueden de ese modo quelar y transportar hierro.

En algunos aspectos la presente invención proporciona complejos de una proteína NGAL mutante de la invención y un sideróforo, incluyendo, pero sin limitarse a, los sideróforos enumerados en el presente documento. En aspectos preferidos el sideróforo se selecciona del grupo que consiste en enteroquelina, pirogalol, carboximicobactina, catecol y variantes o derivados de los mismos. Puede usarse cualquier variante o derivado de tales sideróforos que conserve la capacidad de unirse a hierro (idealmente de una manera insensible al pH) y que conserve la capacidad para unirse a NGAL y/o uno o más de los mutantes de NGAL de la invención.

FABRICACIÓN DE PROTEÍNA NGAL MUTANTES Y COMPLEJOS CON SIDERÓFOROS

Las proteínas NGAL mutantes de la invención pueden fabricarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica para la fabricación de fármacos proteicos. Por ejemplo las proteínas NGAL mutantes pueden prepararse usando técnicas convencionales conocidas para la producción de proteínas recombinantes, por ejemplo suministrando a una célula, tal como una célula bacteriana o una célula de mamífero, un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para un mutante de NGAL bajo el control de un promotor adecuado, y cultivando la célula en condiciones en las que la proteína se expresará. Se conocen bien en la técnica métodos para el cultivo a gran escala, el aislamiento y la purificación de proteínas recombinantes y pueden usarse en la fabricación de los mutantes de NGAL de la presente invención. De manera similar, se conocen en la técnica métodos de producción de péptidos y proteínas de manera sintética y pueden usarse en la fabricación de los mutantes de NGAL de la presente invención.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona proteínas de fusión que comprenden los mutantes de NGAL de la invención y una o más "etiquetas" adicionales. Tales etiquetas adicionales pueden fusionarse al extremo N o C-terminal de los mutantes de NGAL, o pueden en algunos casos añadirse en una ubicación interna hasta el grado de que la inclusión de la etiqueta no afecte de manera adversa la función del mutante de NGAL. Las etiquetas adecuadas incluyen, pero no se limitan a glutatión-S-transferasa (GST), poli-histidina (His), fosfatasa alcalina (AP), peroxidasa del rábano (HRP) y proteína fluorescente verde (GFP). Otras etiquetas adecuadas también resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Las etiquetas pueden ser útiles para varias aplicaciones, incluyendo para ayudar en el aislamiento y/o la purificación de los mutantes de NGAL y/o para facilitar su detección.

Se conoce en la técnica que muchas modificaciones químicas de las proteínas son útiles para mejorar las propiedades de fármacos basados en proteínas y tales modificaciones pueden usarse según la presente invención

para mejorar la estabilidad y reducir la inmunogenicidad de las proteínas NGAL mutantes de la invención para aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, se conoce bien en la técnica que el proceso de unión covalente de cadenas de polímero de polietilenglicol a otra molécula (es decir PEGilación) puede “enmascarar” un agente proteínico con respecto al sistema inmunitario del huésped, y también aumentar el tamaño hidrodinámico (tamaño en disolución), prolongar la semivida circulatoria y mejorar la solubilidad en agua de fármacos basados en proteínas. Se conocen también otras diversas modificaciones químicas y se usan en la técnica y pueden usarse conjuntamente con las proteínas NGAL mutantes de la invención.

Pueden prepararse fácilmente complejos que contienen una proteína NGAL mutante de la invención y un sideróforo, tal como enteroquelina o un derivado o variante de la misma, usando metodologías convencionales conocidas en la técnica, tales como las proporcionadas en la sección de ejemplos de esta solicitud. Por ejemplo, puede prepararse un complejo de NGAL-sideróforo mezclando NGAL (incluyendo NGAL mutante) y un sideróforo juntos en una razón molar de 1:1 (por ejemplo Ent) o 1:3 (por ejemplo catecol). La mezcla puede incubarse a temperatura ambiente durante un tiempo adecuado, por ejemplo 30 minutos, para permitir la formación de complejos. El sideróforo no unido puede retirarse/separarse entonces de los complejos de sideróforo-NGAL unidos usando técnicas de separación convencionales, tales como técnicas basadas en centrifugación, técnicas basadas en filtración u otras técnicas de separación basadas en el tamaño.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO - SOBRECARGA DE HIERRO

En una realización, las proteínas NGAL mutantes de la invención, y complejos y composiciones que comprenden tales proteínas NGAL mutantes, pueden usarse para tratar estados, enfermedades o trastornos asociados con niveles de hierro excesivos o sobrecarga de hierro. En particular, pueden usarse complejos de las proteínas NGAL mutantes de la invención con un sideróforo, tal como enteroquelina, y composiciones que comprenden tales complejos, para quelar hierro en el cuerpo y facilitar su excreción en la orina.

Grandes cantidades de hierro libre en el torrente sanguíneo pueden conducir a daño celular, especialmente en el hígado, corazón y glándulas endocrinas. Las causas del hierro en exceso pueden ser genéticas, por ejemplo el exceso de hierro puede estar provocado por un estado genético tal como hemocromatosis tipo 1 (hemocromatosis clásica), hemocromatosis tipo 2A o 2B (hemocromatosis juvenil), hemocromatosis tipo 3, hemocromatosis tipo 4 (sobrecarga de hierro africana), hemocromatosis neonatal, aceruloplasminemia o atransferrinemia congénita. Los ejemplos de causas no genéticas del exceso de hierro incluyen sobrecarga de hierro en la dieta, sobrecarga de hierro por transfusión (debido a una transfusión de sangre administrada a pacientes con talasemia u otros trastornos hematológicos congénitos), hemodiálisis, enfermedad hepática crónica (tal como hepatitis C, cirrosis, esteatohepatitis no alcohólica), porfiria cutánea tarda, derivación post-portocava, síndrome de sobrecarga dismetabólica, sobredosis de comprimidos de hierro (tal como la provocada por el consumo por niños de comprimidos de hierro destinados a adultos), o cualquier otra causa de sobrecarga de hierro aguda o crónica.

Los dos agentes quelantes de hierro comunes disponibles para el tratamiento de sobrecarga de hierro son deferoxamina (DFO) y deferiprona (DFO oral). Debido a su alto coste y la necesidad de administración parenteral, el quelante de hierro convencional deferoxamina no se usa en muchos individuos con envenenamiento por hierro agudo y/o crónico. La deferoxamina debe administrarse por vía parenteral, habitualmente como una infusión subcutánea continua a lo largo de un período de 12 horas, desde tres hasta siete veces a la semana. El tratamiento requiere mucho tiempo y puede ser doloroso. Como resultado el cumplimiento es a menudo muy malo. Los efectos secundarios incluyen reacciones cutáneas locales, pérdida de audición, nefrotoxicidad, toxicidad pulmonar, retraso del crecimiento e infección. La deferiprona es el único fármaco quelante de hierro activo por vía oral que va a usarse terapéuticamente en estados de sobrecarga de hierro por transfusión. Está indicada como un tratamiento de segunda línea en pacientes con talasemia mayor, para los que la terapia con deferoxamina está contraindicada, o en pacientes con toxicidad grave a la terapia con deferoxamina. La deferiprona es un agente quelante de hierro oral que elimina el hierro del corazón, el órgano diana de la toxicidad y mortalidad del hierro en pacientes con talasemia cargados de hierro. Sin embargo, aunque la deferiprona ofrece la ventaja de la administración oral, está asociada con toxicidad significativa y hay dudas sobre su eficacia y seguridad a largo plazo. Se recomienda que se use en pacientes que no pueden usarse desferrioxamina debido a efectos adversos, alergia o falta de eficacia. La deferiprona está asociada con problemas de seguridad graves incluyendo genotoxicidad, neutropenia y agranulocitosis. Se recomienda la monitorización semanal de los neutrófilos. Pueden producirse problemas articulares y gastrointestinales y se ha notificado toxicidad hepática. Por tanto, existe claramente la necesidad de terapias de quelación de hierro alternativas convenientes, seguras y eficaces, tales como las proporcionadas por la presente invención.

Las proteínas NGAL mutantes de la invención, y en particular complejos de las mismas con sideróforos, pueden usarse para quelar hierro libre y aclarar el exceso de hierro del cuerpo por medio de los riñones, por ejemplo para reducir los niveles circulantes tóxicos de hierro por debajo de los niveles tóxicos.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO - INFECCIONES BACTERIANAS DE LAS VÍAS URINARIAS

Se sabe que NGAL WT tiene actividad bacteriostática, en parte debido a su capacidad de unirse fuertemente a

sideróforos bacterianos, conduciendo al agotamiento de hierro bacteriano y a la inhibición del crecimiento bacteriano (Goetz *et al.*, Mol. Cell. (2002), 10(5) 1033-1043). Las proteínas NGAL mutantes de la invención, como NGAL WT, tienen la capacidad de unirse a sideróforos bacterianos, y por tanto pueden tener actividad antibacteriana. Además, debido a que las proteínas NGAL mutantes de la invención no se reabsorben en el riñón y se acumulan en la orina, son particularmente muy adecuadas para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas de las vías urinarias.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y ADMINISTRACIÓN

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas NGAL mutantes descritas en el presente documento, y complejos de las mismas con sideróforos, y que pueden ser útiles para tratar diversas enfermedades, trastornos y estados, incluyendo sobrecarga de hierro e infecciones bacterianas. También se dan a conocer formulaciones, kits y dispositivos médicos. Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para administración oral o parenteral (incluyendo intramuscular, subcutánea e intravenosa). Los ejemplos de dispositivos médicos incluyen, pero no se limitan a, perlas, filtros, derivaciones, endoprótesis y bucles extracorpóreos que están recubiertos con o contienen de otra forma una NGAL mutante o complejos de la misma, tal como se describe en el presente documento, de manera que el dispositivo se implanta en o se administra de otra forma a un sujeto de una manera que permite que la NGAL mutante o complejos de la misma quelen o absorban el hierro en exceso en el sujeto.

La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las proteínas NGAL mutantes, y complejos de las mismas puede lograrse por medio de cualquier modo de administración adecuado para agentes terapéuticos. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente el modo de administración sin excesiva experimentación. Los modos adecuados pueden incluir administración sistémica o local tal como modos de administración oral, nasal, parenteral, transdérmica, subcutánea, vaginal, bucal, rectal, tópica, intravenosa (tanto en bolo como infusión), intraperitoneal o intramuscular. En realizaciones preferidas, se usa administración oral o intravenosa. En otras realizaciones preferidas, las composiciones de la invención se administran directamente al sitio de acción deseado, tal como por ejemplo, el riñón, por ejemplo mediante inyección local o infusión local o mediante el uso de (por ejemplo conjugación con) agentes útiles para dirigir proteínas o productos farmacéuticos a tejidos específicos, tales como anticuerpos, etc.

Dependiendo del modo de administración previsto, las proteínas NGAL mutantes y complejos de la invención, en una cantidad terapéuticamente eficaz, pueden estar en una forma de dosificación sólida, semisólida o líquida, tal como, por ejemplo, productos inyectables, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas de liberación en el tiempo, elixires, tinturas, emulsiones, jarabes, polvos, líquidos, suspensiones, o similares. En una realización las proteínas NGAL mutantes y complejos de la invención pueden formularse en formas de dosificación unitarias, consecuentes con las prácticas farmacéuticas convencionales. Pueden prepararse composiciones líquidas, particularmente productos inyectables, por ejemplo, mediante disolución o dispersión. Por ejemplo, las proteínas NGAL mutantes y complejos de la invención pueden mezclarse con un disolvente farmacéuticamente aceptable tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similares, para formar de ese modo una suspensión o disolución isotónica inyectable.

Puede usarse administración de productos inyectables parenteral para infusiones e inyecciones subcutáneas, intramusculares o intravenosas. Pueden prepararse productos inyectables en formas convencionales, o bien como disoluciones o suspensiones líquidas o bien formas sólidas adecuadas para disolverse en líquido antes de la inyección. Una realización, para administración parenteral, emplea la implantación de un sistema de liberación lenta o liberación sostenida, según la patente estadounidense número 3.710.795.

Las proteínas NGAL mutantes y complejos de la invención pueden esterilizarse y pueden contener cualesquiera adyuvantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes, promotores de la disolución, sales (por ejemplo para regular la presión osmótica), agentes tamponantes del pH adecuados, y/u otras sustancias farmacéuticamente aceptables, incluyendo, pero sin limitarse a, acetato de sodio u oleato de trietanolamina. Además, las composiciones de la invención pueden contener también otras sustancias terapéuticamente útiles, tales como, por ejemplo, otros quelantes de hierro u otros agentes útiles en el tratamiento de sobrecarga de hierro, u otros agentes útiles en el tratamiento de cualquiera de los estados descritos en el presente documento.

Las composiciones de la invención pueden prepararse según métodos de mezclado, granulación o recubrimiento convencionales, respectivamente, y las presentes composiciones farmacéuticas pueden contener de desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 99%, preferiblemente desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 70% del compuesto o la composición de la invención en peso o en volumen.

La dosis y el régimen de dosificación que van a usarse pueden determinarse según una variedad de factores incluyendo la especie, la edad, el peso, el sexo y el estado médico del sujeto; la gravedad del estado; la vía de administración; la función renal o hepática del sujeto; y el complejo o mutante particular empleado. Un experto en la técnica puede determinar y/o recetar fácilmente una cantidad eficaz de un mutante o complejo de la invención útil para tratar o prevenir un estado, por ejemplo, teniendo en cuenta los factores descritos anteriormente. También se

proporcionan estrategias de dosificación en L.S. Goodman, *et al.*, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 201-26 (5ª ed. 1975). En una realización, se administran composiciones de la invención de manera que el componente de NGAL se administra a un intervalo de dosis de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, y normalmente a una dosificación de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a una dosis que da como resultado una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1,0 ng/ml a aproximadamente 20 ng/ml, en la sangre. La cantidad de un componente de sideróforo de una composición de la invención se elegirá por consiguiente, de manera que se logre la estequiometría deseada, por ejemplo unión 1:1 o 1:3 con la proteína NGAL mutante.

Además de los métodos de tratamiento anteriores, los complejos de proteína NGAL mutante - sideróforo de la invención pueden ser útiles para quelar y/o eliminar hierro de muestras, en el que las muestras no están en el cuerpo de un sujeto. Por tanto, en una realización, la presente invención proporciona un método para eliminar hierro de un fluido, comprendiendo el método mezclar el fluido con un complejo de proteína NGAL mutante - sideróforo durante un período de tiempo suficiente para que el hierro en la muestra se una a los complejos de proteína NGAL mutante - sideróforo, en el que el complejo de proteína NGAL mutante - sideróforo puede quelar hierro de la muestra. En una realización, los complejos de proteína NGAL mutante - sideróforo que tienen hierro unido a los mismos pueden entonces eliminarse de la muestra. En realizaciones preferidas, la muestra es un líquido biológico, tal como sangre, suero, plasma u orina. En determinadas realizaciones los complejos de proteína NGAL mutante - sideróforo se mezclan con la muestra fuera del cuerpo, por ejemplo en un dispositivo extracorpóreo, y la muestra se suministra entonces o se devuelve al cuerpo. Por ejemplo, tales métodos pueden usarse para quelar y/o eliminar el hierro en exceso en muestras de sangre para transfusión, o en un procedimiento de diálisis. Por ejemplo, puede extraerse del cuerpo sangre u otro líquido corporal de un sujeto, tratarse con un compuesto o una composición de la invención para quelar o eliminar el hierro en exceso, y entonces devolverse al sujeto.

Ejemplos

En los ejemplos que siguen, las proteínas NGAL mutantes K3 (SEQ ID NO: 2), K2 (SEQ ID NO: 3), I3 (SEQ ID NO: 4) e I1 (SEQ ID NO: 5) forman parte de la invención.

Las divulgaciones de otros mutantes de NGAL son para fines comparativos sólo y no forman parte de la invención.

EJEMPLO 1

Proteínas NGAL mutantes y su uso como quelantes de hierro terapéuticos y como agentes antimicrobianos

La lipocalina 2 (Lcn2), también denominada lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), es una proteína que se une a hierro con alta afinidad. Para unirse al hierro, NGAL se une a un cofactor denominado sideróforo producido por bacterias (constante de unión $K_m = 0,41 \times 10^{-9}$ M para la interacción NGAL:enteroquelina-hierro; $K_m = 10^{-49}$ M para la interacción enteroquelina (enterobactina):hierro) o compuestos que contienen catecol ($K_m = 0,4 \pm 10^{-9}$ M para catecol-hierro; $K_m = 10^{-45,9}$ M para la interacción catecol:hierro) producidos por una combinación de enzimas bacterianas y de mamífero. NGAL es también una proteína secretora que está notablemente regulada por incremento mediante infección bacteriana y lesión renal aguda y se secreta a la sangre y orina. Durante la infección bacteriana, NGAL secuestra hierro de bacterias mediante unión enteroquelina-hierro, dando como resultado la inhibición del crecimiento bacteriano.

NGAL sérica con enteroquelina:Fe unida se filtra por el glomérulo en el riñón, pero luego la mayoría de la misma se retiene (reabsorbe) por el riñón donde se degrada. Muy poca NGAL escapa a la orina y se excreta. Por ejemplo, tal como demostró una reciente investigación, cuando se inyecta NGAL por vía intraperitoneal, más del 70% de la NGAL WT se acumula en el riñón mientras que menos del 0,1% se encuentra en la orina tras 3 horas.

La captura y retención de NGAL sérica en el riñón se logra mediante la absorción de NGAL por megalina, un receptor de múltiples ligandos también denominado proteína 2 relacionada con receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP2). La megalina se ubica en la membrana plasmática apical de células epiteliales del túbulo proximal en donde entra en contacto con el filtrado glomerular. La megalina se asocia con la cubilina. NGAL puede transportar hierro usando cofactores tales como enteroquelina o catecol y suministrar el hierro específicamente al riñón.

NGAL mutante como agente antimicrobiano y quelante de hierro terapéutico

El punto de corte molecular para la filtración glomerular es aproximadamente 70 kD. Proteína NGAL recombinante o nativa con pesos moleculares de aproximadamente 20,5 kD y 23-25 kD respectivamente puede filtrarse en el glomérulo, pero luego se reabsorbe eficazmente en los epitelios proximales por la megalina y/o por un complejo asociado a megalina que incluye cubilina. La megalina tiene una afinidad de unión por NGAL cargada de hierro y apo-NGAL de aproximadamente 60 nM (Hvidberg, *et al.*, FEBS Letters, 2005, 579: 773-777). La megalina es un receptor de múltiples ligandos, endocítico, responsable de la reabsorción de muchas proteínas incluyendo NGAL,

apoE, lipoproteína lipasa, lactoferrina, apotrina, etc., tras la filtración glomerular (Christensen y Birn, Nature Reviews-Molecular Cell Biology, 2002, 3: 258-2682002). Las interacciones electrostáticas entre regiones ácidas de la megalina de “repeticiones de tipo A” en proteína megalina y regiones básicas de ligandos están implicadas en el reconocimiento de ligando-receptor, es decir la megalina reconoce positivamente superficies cargadas de proteínas ligando (Moestrup y Verrost, Annual Reviews of Nutrition, 2001, 21: 407-428. 2001). Algunos residuos de aminoácido básicos sobre la superficie de proteína NGAL humana pueden por tanto estar implicados en su alta afinidad de unión a megalina, y la mutación de estos residuos básicos puede alterar las interacciones electrostáticas entre NGAL y megalina al tiempo que se conserva la afinidad de unión por enteroquelina-hierro en su cáliz interior. La interacción desmantelada entre NGAL mutante y megalina puede permitir que NGAL mutante:enterocalina:hierro o apo-NGAL mutante se filtren en la orina sin reabsorberse desde el filtrado tras la filtración glomerular. En el primer caso, cuando está presente enteroquelina en el complejo de NGAL mutante, puede absorberse hierro de la sangre y que circule a la orina. Esto puede permitir la eliminación de hierro del sujeto (por ejemplo animal o ser humano) asociado con el sideróforo-hierro. Alternativamente, en el caso de la apo-NGAL mutante, puede conducir a una acumulación de NGAL en la orina que puede inhibir el crecimiento bacteriano en las vías urinarias.

Las proteínas NGAL mutantes de la invención tienen al menos dos posibles aplicaciones en productos terapéuticos clínicos.

En primer lugar, las proteínas NGAL mutantes pueden usarse como quelantes de hierro eficaces para eliminar el hierro en exceso de los sujetos, tales como sujetos humanos, con trastornos de sobrecarga de hierro. A los pacientes con sobrecarga de hierro (por ejemplo debida a hemocromatosis, anemia drepanocítica, talasemia, transfusión múltiple de glóbulos rojos u otros productos biológicos) se les administra NGAL mutante unida a sideróforo libre de hierro, tal como enteroquelina, mediante infusión intravenosa. La enteroquelina quela el hierro sérico formando un complejo de NGAL-enteroquelina-hierro. Este complejo se transporta principalmente al riñón y posteriormente se filtra por el glomérulo. Permanece en el filtrado glomerular sin reabsorberse debido a su incapacidad para unirse a la megalina en las células epiteliales del túbulo proximal. Entonces aparece en la orina y en última instancia se excreta junto con el hierro al que se une. NGAL mutante puede ser una herramienta eficaz para eliminar el hierro excesivo de sujetos humanos sobrecargados de hierro. La razón molar de la unión de NGAL a enteroquelina y hierro es de 1:1:1. Si se administran 10 g de apo-NGAL mutante, que es igual a aproximadamente 500 μ moles, a un paciente sobrecargado de hierro, aproximadamente 500 μ moles o aproximadamente 27,9 mg de hierro pueden unirse teóricamente a NGAL mutante y enteroquelina y suministrarse a la orina para su excreción (suponiendo que la acumulación de proteína NGAL mutante en la orina es del 100%). Éste es un modo muy eficaz para eliminar el hierro excesivo de un paciente humano con sobrecarga de hierro dado que el ser humano sólo pierde 1-2 mg de hierro al día principalmente por medio del desprendimiento de células intestinales y células cutáneas muertas, y sólo obtiene 1-2 mg al día del alimento.

En segundo lugar, proteína NGAL mutante puede usarse como agente antimicrobiano para tratar a pacientes con una infección de las vías urinarias (IVU). Se administra apo-NGAL mutante a sujetos humanos con una IVU mediante infusión. La NGAL mutante se transporta al riñón y se filtra a la orina sin reabsorción debido a su pérdida de afinidad de unión por megalina. Una vez dentro de la orina, la proteína apo-NGAL mutante se une a sideróforos de bacterias de IVU (por ejemplo enteroquelina) y da como resultado la inhibición de su crecimiento.

Diseño experimental y procedimientos experimentales

Clonación de NGAL humana

Se obtiene ADNc de NGAL humana (número de registro de Genbank: NM_005564) de Open Biosystems, y el marco de lectura abierto que codifica para la proteína NGAL secretada se amplifica por PCR usando una ADN polimerasa PfuUltra (Stratagene), y se clona en un vector de plásmido pGEX-4T-3 (GE Healthcare) para la mutagénesis dirigida al sitio.

Estructura de la proteína NGAL humana

Basándose en la estructura de la proteína NGAL humana, residuos de aminoácido, especialmente residuos básicos (arginina, lisina e histidina), sobre la superficie de la proteína pueden mediar en la interacción electrostática con megalina para unión de alta afinidad (figura 1 y figura 4A).

Designación de mutantes de NGAL

Hay cinco residuos de aminoácido básicos sobre la superficie de la proteína NGAL que están conservados (R43, 72, 140 y K142, 157) entre diferentes especies de mamífero incluyendo ser humano, ratón, rata, chimpancé, bovino, perro, jabalí y mono rhesus, mientras que hay 13 residuos básicos no conservados (R130; K15, 46, 50, 59, 62, 73, 74, 75, 97, 149; H118, 165). Estos residuos básicos pueden mutarse a otros residuos no básicos.

Generación de mutantes de NGAL

Se mutó una variedad de diferentes residuos de aminoácido sobre la superficie de la proteína NGAL usando un kit de multi-mutagénesis Quickchange Site-Directed Lightning (Stratagene), y esto dio como resultado la generación de muchos mutantes con mutaciones en diferentes sitios de la proteína NGAL. Se prepararon 57 mutantes de NGAL tal como se muestra en la tabla 2, SEQ ID NO: 2-10, 21-68, 247-251.

Producción de proteína NGAL

Se someten a electroporación constructos de plásmidos de tipo natural y mutantes al interior de *E. coli* BL21 (GE Healthcare), y se induce la expresión de proteínas apo-NGAL de tipo natural y mutantes mediante la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,2 mM durante 5 horas, y posteriormente se purifican mediante una combinación de precipitación basada en GST y filtración en gel en un sistema de FPLC con una columna de Sefarosa.

Afinidad de unión de NGAL mutante por enteroquelina y hierro

Las proteínas mutantes de NGAL se examinan para determinar su capacidad para unirse a enteroquelina y hierro usando una forma radiactiva de hierro, $^{55}\text{Fe}^{3+}$. Se estimó la afinidad de unión de NGAL por enteroquelina y $^{55}\text{Fe}^{3+}$ examinando el porcentaje de $^{55}\text{Fe}^{3+}$ que retuvieron las proteínas NGAL mutantes y de tipo natural, y la proteína NGAL de tipo natural puede usarse como control positivo.

Preparación de complejo de NGAL-enteroquelina-hierro

El complejo de NGAL-enteroquelina-hierro se prepara mezclando proteína NGAL, enteroquelina y $^{55}\text{Fe}^{3+}$ juntos en una razón molar de 1:1:1 (4 nmol cada uno). Se incuba la mezcla a TA durante 30 minutos, y se lava en un instrumento 10 K Microcon mediante centrifugación 4 veces a 7000 rpm durante 5 minutos para eliminar la enteroquelina y $^{55}\text{Fe}^{3+}$ no unidos, y el complejo de NGAL-enteroquelina- $^{55}\text{Fe}^{3+}$ se retiene en el instrumento Microcon.

Examen de mutantes de NGAL en ratones

Hay un 76% de identidad de aminoácidos y un 87% de similitud de aminoácidos entre proteínas megalina de ser humano y ratón, lo que indica que tienen probablemente propiedades de unión muy similares. En los presentes experimentos se sometió a prueba la unión de proteína NGAL humana a megalina de ratón. Debido al alto grado de identidad y similitud de aminoácidos entre proteína megalina de ser humano y ratón, el sistema de ratón proporciona un modelo útil para examinar proteínas NGAL mutantes para determinar su capacidad para escapar de la reabsorción renal dependiente de megalina-cubulina y en última instancia para suministrarse a la orina.

El complejo de NGAL-enterocalina- $^{55}\text{Fe}^{3+}$ radiomarcado se inyecta por vía intraperitoneal en ratones C57BL/6 hembra (4 semanas), y se recoge la orina en jaulas metabólicas. Tras la recogida de la orina durante 3 horas, se sacrifican los ratones y se recogen los riñones y el hígado, se pesan y se solubilizan en una disolución de NaOH 0,5 M y SDS al 1% a 70°C durante la noche. Se examina la radioactividad en orina, riñón e hígado en un contador de centelleo, y se calculará la acumulación del complejo de NGAL-enteroquelina-hierro como el porcentaje del complejo inyectado total.

Resultados experimentales

Se generaron 57 mutantes de NGAL (tabla 2; SEQ ID NO: 2-10, 21-68, 247-251). Se produjeron veintinueve apo-proteínas mutantes en *E. coli* BL21, y se examinaron para determinar su afinidad de unión a enteroquelina y la circulación en ratones C57BL/6 tras la inyección intraperitoneal (i.p.). Tal como se muestra en la figura 3A, todas las proteínas NGAL humanas mutantes retenían del 16,7% al 45,7% del hierro total tras la incubación con enteroquelina-hierro en una razón molar de 1:1:1 (4 nmol cada uno) durante 30 minutos a temperatura ambiental, indicando su afinidad de unión conservada por enteroquelina-hierro (altas cantidades de enteroquelina aumentarán la carga de NGAL).

Cuando se administraron mediante inyección i.p., seis complejos de NGAL mutante-enteroquelina- $^{55}\text{Fe}^{3+}$ mostraron una acumulación notablemente aumentada en orina en comparación con complejo de NGAL de tipo natural (mutantes K3, K2, I3, I1, K5 y K1). También se observó disminución de la acumulación en el hígado y riñón tras 3 horas (figuras 3B, C, D; tabla 1). Había el 6%, el 6,9%, el 1,9%, el 9,3%, el 19,6% y el 2,9% de complejos de NGAL mutante I1, I3, K1, K2, K3 y K5 que se suministraron a la orina tras 3 horas, respectivamente, mientras que solo había el 0,18%, el 0,13%, el 0,26%, el 0,1%, el 0,11%, el 0,17%, el 0,27% y el 0,05% de complejos de NGAL mutante A2, B4, C3, D1, F2, G3, H2 e I5 en la orina.

Usando la estructura cristalina de NGAL de tipo natural (número de registro de PDB: 1ngIA) como sustrato, se predijo la estructura de la proteína mutante K3 usando Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org>). Tal como se muestra en la figura 4A, la estructura tridimensional predicha de la proteína mutante K3 contiene un bolsillo similar a la proteína de tipo natural, respaldando el hallazgo de que la afinidad por enteroquelina-hierro se conserva. Sin embargo, la proteína mutante K3 presentaba menos aminoácidos positivos en la superficie accesible al disolvente

que la proteína NGAL de tipo natural (figura 4B), consecuente con su capacidad disminuida para la interacción electrostática con megalina, y su acumulación aumentada en la orina una vez introducida en ratones.

5 Tabla 1. Unión de proteínas Ngal mutantes a enteroquelina- $^{55}\text{Fe}^{3+}$ y acumulación de Ngal mutante-enteroquelina- $^{55}\text{Fe}^{3+}$ en orina, riñón e hígado 3 horas tras la inyección i.p. en ratones C57BL/6.

Mutantes de Ngal	Unión de enterocalina-hierro (%)	Acumulación 3 horas tras la inyección i.p. (%)		
		Orina	Riñón	Hígado
A1	23,4	0,55	0,32	1,10
A2	22,6	0,18	0,37	1,11
A3	26,6	0,23	0,39	1,52
B1	20,7	0,22	0,26	1,30
B2	25,7	1,22	0,34	1,27
B3	26,9	0,30	0,26	1,01
B4	45,7	0,13	0,32	0,71
C1	26,2	0,72	0,21	1,15
C3	20,6	0,44	0,33	1,22
C5	21,9	0,26	0,44	0,85
D1	29,1	0,10	0,26	0,94
D2	18,1	0,11	0,16	0,60
F1	26,1	0,51	0,69	0,79
F2	21,5	0,11	0,40	0,51
F4	22,8	1,65	0,43	1,68
F5	27,7	1,23	0,29	1,61
G1	33,5	0,28	0,05	0,33
G3	26,9	0,17	0,58	0,30
H1	38,7	0,37	0,15	0,89
H2	36,1	0,27	0,12	1,06
H3	31,1	0,30	0,15	1,25
H5	38,6	0,24	0,09	1,07
I1	32,1	6,00	0,20	1,21
I3	42,8	6,90	0,27	0,55
I5	16,7	0,05	0,10	0,02
K1	21,2	1,90	0,76	0,82
K2	31,4	9,60	0,43	0,68
K3	22,9	19,60	0,27	0,40
K5	28,4	2,90	0,18	1,37

EJEMPLO 2

- 10 Los números en superíndice en este ejemplo se refieren a las referencias numeradas en la lista de referencias que sigue a este ejemplo. Los mutantes K1 - K8 a lo largo de todo el ejemplo 2, y las figuras 6-17, representan los mutantes D1-4, D1-4-1, D1-4-2-1, d1-4-2-1-1, d1-4-2-1-3, d1-4-2-1-4, WT-3 y D1-4-2 para los que se proporcionan las secuencias en el presente documento en la tabla 2.
- 15 El transporte de hierro supone un problema significativo puesto que el hierro férrico libre es insoluble (< 10⁻¹⁸ M) en disoluciones aerobias a pH fisiológico, mientras que tras la solubilización mediante algunos quelantes, se crea una

forma reactiva de hierro que puede producir especies tóxicas de oxígeno. En consecuencia se requieren mecanismos especializados para la circulación de hierro y estos mecanismos especializados se encuentran en proteínas que utilizan motivos conservados para unirse directamente a hierro (transferrina y ferritina) o utilizan cofactores incrustados. Mientras que el transporte de hierro extracelular está mediado en gran medida por transferrina, los ratones que portan delecciones de estos genes presentaron sorprendentemente fenotipos limitados (Barasch, *Developmental Cell*, 2009). Se encontró que un miembro de la superfamilia de lipocalina denominado Ngal actuaba como un portador de hierro de alta afinidad (Barasch, *Molecular Cell*, 2002) cuando se unía a una familia de cofactores novedosos denominados los catecoles o sideróforos bacterianos relacionados contruidos a partir de catecol. En presencia de hierro, la formación del complejo Ngal:sideróforo:FeIII se producía a afinidad subnanomolar (Barasch, *Nature Chemical Biology*, 2010) formando una proteína roja brillante, que era estable durante muchos días en disolución y estable *in vivo* durante el transporte de su hierro fuertemente unido. Ngal se expresa *in vivo*, pero varios estímulos de “daño” elevan su concentración en órdenes de magnitud. Después de eso, Ngal circula en el suero y se cree que se captura por el receptor megalina del riñón, en donde Ngal aclara el complejo de sideróforo:Fe. Aunque se conoce mucho sobre el metabolismo de la forma urinaria de Ngal (se expresa a partir de la nefrona distal y se excreta en la orina como una proteína de longitud completa), se conoce menos sobre este sistema de aclaramiento y el papel del receptor megalina, que es el único receptor confirmado para Ngal. Para estudiar este proceso en profundidad, puede examinarse un mutante condicional de megalina. Además, para estudios en ratones de tipo natural, puede someterse a prueba una serie de mutantes de Ngal. Algunos de tales mutantes sortean el túbulo proximal en donde se ubica la megalina, dando como resultado su presencia en la orina. Estos mutantes pueden unirse todavía a sideróforo:FeIII a alta afinidad (y producir proteínas de color rojo), y pueden excretar definitivamente hierro, probablemente de una manera inactiva redox. De hecho, en vez de donar hierro a microorganismos, que es la preocupación principal de quelantes de moléculas pequeñas, los complejos de Ngal:sideróforo:Fe secuestran hierro de las bacterias. Puede someterse a prueba la hipótesis de que la megalina es el receptor de reciclaje clave para Ngal. Se espera que cuando se inhiba el complejo de megalina-Ngal, Ngal pueda unirse fuertemente a hierro en la orina, sirviendo por tanto como un agente terapéutico seguro para los síndromes comunes de enfermedades de sobrecarga de hierro.

Las enfermedades de sobrecarga de hierro son casos comunes en la medicina clínica, y se ha demostrado que sus terapias son tóxicas para muchos linajes celulares así como inductoras del crecimiento bacteriano. Sobrecarga de hierro es una secuela común de las transfusiones de sangre, pero se conoce bien en hepatitis, enfermedad renal crónica así como en enfermedades hereditarias comunes tales como hemocromatosis. La presente invención implica el descubrimiento de una ruta de circulación de hierro basada en la proteína Ngal, que se expresa masivamente en el ser humano en diferentes tipos de daño tisular. Estos estudios en el metabolismo de Ngal proporcionan pruebas de concepto de que Ngal puede usarse como quelante de hierro terapéutico seguro.

La transferrina se une específicamente a hierro en la circulación, lo que conserva su biodisponibilidad e impide su toxicidad redox. Sin embargo, aparece hierro no unido a transferrina (NTBI) en pacientes con una variedad de enfermedades¹⁻³ incluyendo tanto causas genéticas como causas no genéticas. NTBI daña al hígado⁴⁻⁷, corazón⁸⁻¹², glándulas endocrinas¹³⁻¹⁸ y riñón¹⁹⁻²¹ y una sobrecarga grave puede ser mortal^{22,23} al catalizar especies reactivas de oxígeno (ROS) por medio de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton²⁴⁻²⁵.

Hasta la fecha, dos moléculas pequeñas, deferoxamina (DFO) y deferiprona están disponibles para la quelación de NTBI y el tratamiento de sobrecarga de hierro²⁶⁻²⁸. Sin embargo, estas moléculas demuestran una toxicidad significativa. DFO provoca reacciones cutáneas, pérdida de audición, toxicidad renal y pulmonar, y lo más interesantemente infección fúngica²⁹⁻³² que resulta porque DFO (que es un derivado de un “sideróforo” fúngico) puede suministrar hierro a patógenos³². La deferiprona también está asociada con genotoxicidad, neutropenia y agranulocitosis y enfermedad renal^{33,34}. Por tanto, se requieren nuevos agentes para la excreción de NTBI no tóxico, que no suministra hierro a microorganismos.

La presente invención utiliza un mecanismo endógeno de transporte de hierro (*Molecular Cell*, 2002; *Nature N&V*, 2005; *Nature Chemical Biology*, 2010)³⁵⁻³⁸, que se manipula para exportar de manera segura hierro del cuerpo. El portador se denomina lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (Ngal). La presente invención implica mutantes de Ngal que permiten que Ngal se excrete de manera segura en la orina, todavía estando fuertemente unida a su hierro.

Ngal es una proteína portadora de hierro pequeña (22 KDa) que se expresa notablemente en el suero y en la orina cuando un ser humano o un animal se expone a un estímulo que normalmente provoca lesión renal aguda (AKI: *JASN*, 2003; *JCI*, 2005; *Lancet*, 2005; *Ann Int Med*, 2008)³⁹⁻⁴². Como resultado, la proteína se conoce ahora bien como un “biomarcador” de AKI, confirmando más de 100 artículos su expresión robusta, aunque sólo unos pocos laboratorios estudian su biología. Se ha encontrado que una vez que se expresa Ngal, se secreta rápidamente a la circulación, en donde puede capturar hierro uniéndose a cofactores tales como catecoles endógenos o sideróforos de tipo catecolato relacionados (enteroquelina, Ent)³⁶ que sintetizan bacterias para capturar hierro (véase la figura 6). Por tanto, Ngal interrumpe el suministro de nutrientes de hierro para las bacterias, proporcionando bacteriostasis.

Los complejos de Ngal son estables para su transporte, y se filtran por el glomérulo y los captura el túbulo proximal (figura 7), en donde se degrada Ngal y se libera hierro para su reciclaje³⁸. Se cree que Ngal experimenta endocitosis

por megalina en células del túbulo proximal y se ha caracterizado una interacción directa entre Ngal-megalina usando resonancia de plasmón superficial (SPR/Biacore)⁴³. La presente invención implica mutantes de Ngal que pueden sortear la megalina, se unen aún a Ent:hierro, proporcionando por tanto un agente terapéutico que puede excretar de manera segura NTBI en la orina.

5

Evaluación de la interacción Ngal-megalina usando mutantes de Ngal

Puesto que la megalina puede ser el principal receptor que media en la reabsorción de Ngal filtrada⁴³, se produjeron 40 proteínas NGAL mutantes, algunas de las cuales se cree que seleccionan como diana la interacción Ngal-megalina. La hipótesis de la megalina puede someterse a prueba usando uno de estos mutantes (K6) y sus derivados optimizados, que sortean parcialmente el túbulo proximal y aparecen en la orina. Este mutante puede usarse para estudiar las interacciones de proteína, y la captura celular y en órganos en ratones de tipo natural y en ratones deficientes en megalina condicionales, para confirmar que la interrupción de megalina permite la excreción de hierro. También pueden someterse a prueba mutantes adicionales usando este sistema.

15

Evaluación de la interacción Ngal:Ent:Fe^{III} en mutantes de Ngal

Ngal contiene un cáliz central en donde, cuando se une Ent:Fe^{III}, se produce una proteína roja brillante³⁵ (figura 8). Los mutantes de Ngal, modificados por ingeniería genética para reducir sus interacciones con megalina, también eran de color rojo brillante cuando se mezclaban con Ent:Fe^{III}, indicando retención de la afinidad de ligando. Los complejos de Ngal pueden analizarse cuantitativamente usando técnicas de extinción de fluorescencia y cristalografía de rayos X.

20

Excreción segura de hierro mediante el suministro NGAL mutante:Ent:Fe^{III}

25

Pueden administrarse K6 y mutantes optimizados a ratones para someter a prueba la quelación de NTBI y la excreción urinaria de Fe^{III} en modelos murinos de hemocromatosis hereditaria (*HFE*^{-/-})^{44,45} y adquirida⁴⁴. La eficacia puede evaluarse midiendo el agotamiento de NTBI del suero y el hígado, y puede descartarse la toxicidad midiendo el estrés oxidativo y la expresión de Ngal endógena, que se descubrió previamente que indica la aparición de daño renal.

30

Significación Los pacientes sobrecargados de hierro demuestran una saturación de transferrina sérica elevada (>50%) y niveles de ferritina sérica elevada (>1000 µg/l)¹⁻³. También demuestran hierro no unido a transferrina en la circulación (NTBI, por ejemplo 0,9-12,8 µmol/l en suero talasémico; 4-16,3 µM en sueros de hemocromatosis hereditaria (HH)²), así como una reserva de hierro lábil (LIP) dentro de las células⁴⁶. Estas reservas anómalas de hierro participan en reacciones de Haber-Weiss y Fenton que oxidan lípidos y proteínas y mutan nucleótidos formando especies de hidroxilo, ferrilo o perferrilo^{24-25,47}. En última instancia, se encuentra muerte celular en una variedad de órganos sensibles, incluyendo hígado (fibrosis/cirrosis y carcinoma hepatocelular)⁴⁻⁷, corazón (cardiomiopatía congestiva)⁸⁻¹², riñón (necrosis y apoptosis de células del túbulo proximal)¹⁹⁻²¹ y glándulas endocrinas (diabetes, hipotiroidismo e hipogonadismo)¹³⁻¹⁸.

35

40

En general hay dos tipos de trastornos de sobrecarga de hierro, hemocromatosis hereditaria (HH) y hemocromatosis adquirida (AH). La HH está provocada por pérdida de función de genes asociados con la regulación del metabolismo del hierro, tales como *HFE* (HH de tipo 1), *HJV* (HH de tipo 2A), *HAMP* (HH de tipo 2B), *TFR2* (HH de tipo 3), *SLC40A1* (HH de tipo 4), *CP* (aceruloplasminemia), *TF* (hipotransferrinemia)^{3,48}. En la entidad más común, el alelo *HFE* C282Y de tipo I, el 28% de los varones estaban sobrecargados de hierro⁴⁹. AH, en cambio, está provocada por transfusiones de sangre, talasemia mayor, anemias sideroblástica y hemolítica, sobrecarga de hierro de la dieta, enfermedades renal y hepática crónicas debidas a hepatitis C o alcohol o porfiria^{3,44,48}. Los 5 millones de transfusiones de sangre, >15 millones de unidades/año en los Estados Unidos son la causa más común de AH⁵⁰. Las transfusiones de sangre provocan sobrecarga de hierro porque aunque el ser humano pierde 1-2 mg hierro al día, cada unidad de sangre contiene 250 mg de hierro y aparecen claras evidencias de toxicidad tras 20 transfusiones⁵¹⁻⁵³. Las enfermedades renales crónicas también pueden producir un síndrome de deposición de hierro en exceso en el túbulo proximal y en el espacio urinario. El hierro se deposita en la corteza del riñón en nefropatía asociada a VIH⁵⁴ así como en otras formas de síndrome nefrótico⁵⁵. El hierro urinario es también un hallazgo común en AKI de diversas etiologías incluyendo hemoglobinuria y mioglobinuria⁵⁶, quimioterapia (cisplatino⁵⁷; doxorubicina⁵⁸), isquemia-reperusión^{59,60} e isquemia por trasplante⁶¹. Se cree que la liberación de hierro en la orina es una etapa crítica en el daño celular⁶²⁻⁶⁹. En resumen, tanto los pacientes de HH como los de AH padecen daño orgánico sin terapia de quelación de hierro^{22,23}.

55

60

Dos productos químicos quelantes de hierro están actualmente en uso clínico²⁶⁻²⁸, pero ambos están limitados por la toxicidad y problemas de seguridad a largo plazo (por ejemplo "Deferasirox: Uncertain future following renal failure fatalities, agranulocytosis and other toxicities. Expert Opin Drug Saf. 2007 6:235-9")²⁹⁻³⁴. La presente invención proporciona una estrategia novedosa que se aprovecha de los mecanismos endógenos de la circulación de hierro que se manipula para desarrollar un quelante de hierro no tóxico, altamente eficaz para el tratamiento de sobrecarga de hierro. Ngal es muy adecuada para este enfoque debido a las siguientes características. Ngal se identificó por primera vez como un portador de hierro y factor de crecimiento en células renales³⁵. En segundo lugar, Ngal se une

65

a hierro (figura 6) usando sideróforos bacterianos (tales como enteroquelina [Ent] de bacterias Gram-negativas, bacilbactina de bacterias Gram-positivas y carboximicobactinas de micobacterias^{36,70}) o alternativamente catecoles endógenos encontrados en mamíferos³⁸. Ent y catecoles tienen una afinidad por hierro extremadamente alta ($K_d=10^{-49}\text{M}$ y $10^{-45,9}\text{M}$, respectivamente)^{71,72}, y Ngal se une fuertemente a Ent:Fe y catecol:Fe ($K_d=0,4\text{ nM}$)^{36,38}, lo que permite que estos complejos secuestren hierro. De hecho, la quelación de sideróforos bacterianos por Ngal es un aspecto crítico de la respuesta inmunitaria innata, dado que los ratones Ngal^{-/-} no aclaran inóculos bacterianos³⁷. Estos datos están en contraposición con el quelante de hierro de alta afinidad DFO ($K_d=10^{-30}\text{M}$)⁷³ que puede suministrar su hierro a *Rhizopus* e inducir micosis por *Mucor* mortal³². En tercer lugar, la unión de hierro a Ngal limitó su reactividad tal como se demostró por la supresión de pruebas de fenantrolina y 3'-(p-hidroxifenil)fluoresceína (HPF) de Fe²⁺ reactivo; en otras palabras, la unión a Ngal bloqueó la reacción de Fenton³⁸. En cuarto lugar, Ngal puede cargarse con hierro *in vivo* cuando se presentaba con Ent:⁵⁵Fe o catecol:⁵⁵Fe; el complejo de Ngal puede recuperarse entonces del suero cinco minutos después. En cuarto lugar, Ngal cargada con hierro se desplazaba a través de la circulación y se dirigía al riñón de ratón, tal como se demostró mediante autorradiografía^{38,40} (figura 9). Este proceso implicaba lo más probablemente filtración glomerular del complejo de Ngal, seguido por endocitosis mediada por megalina en la membrana apical del túbulo proximal⁴³ puesto que se encontró Ngal en la orina de ratones deficientes en megalina⁷⁴ (figura 10), y puesto que el análisis de resonancia de plasmón superficial (Biacore) mostró que Ngal y megalina interaccionaban directamente ($K_d=60\text{ nM}$)⁴³. En quinto lugar, el mismo proceso estaba en marcha en seres humanos, puesto que se visualizó Ngal en lisosomas del túbulo proximal de pacientes con AKI (figura 6). En sexto lugar, Ent tenía una afinidad muy alta por Ngal incluso en ausencia de hierro ($K_d=3,57\text{ nM}$)⁷⁵, mientras que el propio catecol se unía a Ngal con escasa afinidad ($K_d=200\pm6\text{ nM}$)³⁸ lo que significa que Ent era incluso un mejor candidato para la captura y el transporte de hierro que el catecol. Finalmente, el complejo de Ngal:Ent:Fe^{III} era insensible al pH, no pudiendo disociarse incluso a pH 4,0, mientras que los complejos de Ngal:catecol:Fe^{III} eran estables hasta pH 6,5, pero la acidificación revirtió progresivamente la extinción de fluorescencia dependiente de catecol y dio como resultado la disociación de hierro a pH 6,0 (figura 12)³⁸. Por tanto, debido a su estabilidad en pH ácido, no se espera que Ngal:Ent:Fe^{III} se disocie en orina acidificada.

En resumen, Ngal:catecol/Ent pueden quelar NTBI en la circulación con alta afinidad y aclarar hierro en el riñón. Esta ruta es activa en seres humanos *in vivo* y hace circular potencialmente grandes cantidades de Ngal y hierro: si la TFG es de 140 l/día y la concentración de Ngal en suero es de 20 ng/ml, se reciclan 2,8 mg/día de NGAL (0,14 μmoles) y 8 μg de hierro en el túbulo proximal, pero en el entorno de isquemia, insuficiencia renal, septicemia, el nivel de Ngal se eleva 100-1000 veces, lo que significa que puede estar en marcha un mecanismo muy sustancial de aclaramiento (dependiendo de la GFR residual). Por tanto, para entender la captura de hierro en el riñón y para crear una nueva terapia, se ha decidido alterar la reabsorción de Ngal.

Innovación: A. La primera área de innovación tiene que ver con el tratamiento de enfermedades de sobrecarga de hierro que durante demasiado tiempo se ha basado en quelantes tóxicos²⁹⁻³⁴. La presente invención proporciona una estrategia para desarrollar quelantes de NTBI de alta eficacia, no tóxicos. Esta estrategia tiene muchas ventajas con respecto a los quelantes de hierro actuales porque (1) Ngal proporciona una ruta endógena para suministrar hierro al riñón^{35,36,38,39}, (2) Ngal:Ent tiene una afinidad mayor por hierro que cualquier otra sustancia conocida^{71,72}, (3) Ngal:Ent:Fe^{III} es inactivo redox³⁸, (4) Ngal:Ent:Fe^{III} es estable en orina acidificada³⁸ y por tanto (5) puede quelar hierro urinario, aliviando quizá el daño en determinadas enfermedades renales. B. Una segunda área de innovación es una descripción del metabolismo de Ngal-hierro. Puede usarse un ratón bioluminescente para comparar el momento y la intensidad de la expresión génica de Ngal en el riñón y en la orina, lo que ha proporcionado una comprensión clara de la biosíntesis y excreción de esta reserva (Paragas *et al*, en Review). Mutantes de Ngal pueden someter a prueba directamente el papel de megalina en ratones de tipo natural y proporcionar datos complementarios para el análisis de ratones defectuosos en megalina. Este enfoque también puede someter a prueba la noción de que un segundo receptor de NGAL (24p3R)⁷⁶ puede estar presente en la nefrona.

Evaluación de la interacción Ngal-megalina mediante la generación de mutantes de Ngal

Se cree que la megalina se une a sus ligandos usando una serie de interacciones electrostáticas entre dominios de unión a ligando cargados negativamente de la megalina y los dominios de superficie cargados positivamente del ligando⁷⁷. En consecuencia, mutando residuos de superficie cargados positivamente de Ngal puede alterarse la interacción megalina-Ngal. Se identificaron dominios de superficie de Ngal humana basándose en su estructura cristalina (R. Strong; n.º de PDB 1L6M) usando el software Pymol⁷⁸. Los dominios de superficie contenían 18 aminoácidos cargados positivamente (Lys 15, Lys 46, Lys 50, Lys 59, Lys 62, Lys 73, Lys 74, Lys 75, Lys 98, His 118, Arg 130, Lys 149, e His 165, R43, 72, 140 y K142, 157), 5 de los cuales se conservaban en mamíferos³⁶, y se eligieron estos residuos para mutagénesis dirigida al sitio. Se clonó el ORF de Ngal humana (sin secuencia de péptido señal) en el plásmido de expresión bacteriana pGEX-4T-3 (Amersham) para generar una fusión GST-Ngal para crear un molde para la mutagénesis. Entonces se mutaron a alanina los residuos de superficie cargados positivamente conservados. Se mutaron los aminoácidos no conservados a residuos no cargados positivamente que ocupaban la misma posición en proteínas NGAL no humanas. Para la mutagénesis, se usó una estrategia individual o combinada con el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick-Change (Stratagene), produciendo 40 clones mutantes de Ngal. Entonces se produjeron proteínas NGAL mutantes y de tipo natural en *E. coli* BL21 mediante inducción con IPTG 0,2 mM, y purificación mediante aislamiento por afinidad basada en GST y cromatografía de filtración en gel usando los protocolos establecidos^{35,38}. Entonces se examinaron funcionalmente estas proteínas Ngal

introduciéndolas (80 µg/400 µl) en ratones C57BL/6 (4 semanas) para identificar qué mutantes podían sortear la absorción renal y aparecer en la orina en el plazo de 3 h. Se detectaron los mutantes de Ngal K1, K2, K3, K5, K6 y K8 en la orina mediante SDS-PAGE así como mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo específico de Ngal humana desarrollado en rata (R&D Systems) (Ngal recombinante=21 KDa; Ngal endógena=25 KDa), lo que sugiere que las mutaciones daban como resultado una pérdida de afinidad para los receptores de reciclaje en la membrana plasmática apical de epitelios del túbulo proximal. En cambio, los mutantes K4 y K7, de tipo natural, no pudieron detectarse en la orina y en consecuencia se reabsorbían lo más probablemente (figura 13). Estos datos proporcionan una información valiosa sobre la interacción Ngal-megalina porque someten a prueba si variaciones en la reabsorción de Ngal pueden atribuirse a variaciones en la interacción megalina-Ngal, proporcionando un entendimiento de los mecanismos de aclaramiento de Ngal en suero, y permitiendo la optimización de mutantes para excretar hierro.

Base estructural de la interacción NGAL-megalina

Interacciones con megalina

La interacción entre NGAL humana de tipo natural (libre de ligando) y megalina acoplada a chip ($K_d \approx 60 \text{ nM}$)⁴³ purificada a partir de corteza renal humana se analizó previamente mediante cromatografía de afinidad de α_2 -macroglobulina⁷⁹. Puede usarse la tecnología Biacore T100 para comparar las interacciones de NGAL de tipo natural y K6 (u otro mutante) con megalina. También puede someterse a prueba si la unión a ligando influye en la interacción Ngal-megalina usando sideróforos bacterianos y ligandos de catecol. Pueden calcularse los datos con el software BIAevaluation 4.1 (Biacore), que ajusta globalmente los datos para deducir parámetros cinéticos y de equilibrio. También puede usarse una gama de condiciones de acoplamiento y regeneración, aunque la captura con anticuerpos proporciona a menudo los datos más limpios.

Endocitosis mediada por megalina

Pueden usarse modelos celulares de expresión de megalina clásicos para investigar la unión a megalina y la endocitosis. Tales células incluyen HK-2⁹⁰ y epitelios de saco vitelino de rata Brown Norway⁴³. Las células de saco vitelino de rata son importantes porque la megalina es el único receptor que media en la endocitosis de Ngal humana en estas células, puesto que la captación se suprimió completamente con anticuerpos anti-megalina⁴³ (los anticuerpos neutralizantes demostraron ser más eficaces que ARNhp de megalina). Pueden marcarse proteínas de tipo natural y mutantes K6 (y otros mutantes) con sondas fluorescentes (Alexa 488, Molecular Probes) limpiadas mediante filtración en gel (GE Biotech, PD10) y diálisis (casete Pierce 10K)^{35,43} con el fin de estudiar su tasa de captación (50 µg/ml en DMEM libre de suero durante 0,5-6 horas) en presencia o ausencia de anticuerpos anti-megalina de ser humano o de rata (Santa Cruz; 200 µg/ml)⁴³ que se mostró previamente que bloqueaban la captación de Ngal humana de tipo natural en células BN⁴³. La endocitosis de Ngal puede medirse tanto usando un microscopio de barrido láser confocal invertido LSM510-META de Zeiss como inmunotransferencias de extractos celulares para detectar la presencia de Ngal humana. Estos experimentos pueden determinar si la incapacidad de capturar K6 (u otros mutantes) puede atribuirse a interacciones Ngal-megalina defectuosas y si el defecto de afinidad o el defecto de endocitosis es verdaderamente parcial. Si es así, entonces pueden proporcionarse mutaciones adicionales para alterar las interacciones con megalina restantes. Los residuos de superficie cargados positivamente restantes en K6 (u otros mutantes) pueden mutarse usando un enfoque individual o de combinación como anteriormente, y luego someterse a prueba reiterativamente usando los ensayos Biacore y los ensayos de captación celular. Como resultado de estas mutaciones, pueden definirse el papel de la megalina en la captura de Ngal y el dominio de unión a megalina de Ngal. Adicionalmente pueden generarse mutantes optimizados.

Receptores alternativos

Los datos (figura 9 y 13) y un informe previamente publicado⁴³ sugieren que la megalina es un receptor esencial para Ngal. Sin embargo, puede haber receptor(es) distinto(s) de megalina en el túbulo proximal. El principal candidato es 24p3R (SLC22A17), que se encuentra por todo el riñón y se mostró que media en la endocitosis de Ngal⁷⁶, pero su función aún no está confirmada. Pueden generarse células HEK293 transfectadas de manera estable que sobreexpresan 24p3R humano, y puede determinarse la captación de Ngal:Ent:Fe^{III} y Ngal mutante K6 y de tipo natural marcados con Alexa-488, por ejemplo usando microscopía confocal e inmunotransferencias. Si 24p3R estimula la captación de NGAL de tipo natural, puede ser un receptor para Ngal, y el mutante K6 (y otros mutantes) puede mostrar interacciones defectuosas con este receptor.

Distribución de mutantes de Ngal *in vivo*

Puede realizarse una prueba adicional de la interacción Ngal-megalina usando un modelo murino deficiente condicional en megalina⁹¹, en el que se deleciona la megalina en los epitelios del túbulo proximal usando ratones con megalina flanqueada por sitios loxP y gGT-Cre que deleciona específicamente genes en el 80% de las células en el segmento S3 del túbulo proximal⁹². Según TE Willnow⁹¹, estos ratones delecionados de manera condicional son viables y fértiles. La eficacia de la delección de megalina puede confirmarse mediante tinción inmunohistoquímica

con anticuerpos anti-megalina. Si la delección es completa, pueden cruzarse ratones megalina^{ff} con ratones megalina^{f/+}gGT-Cre para generar ratones megalina^{ff}:gGT-Cre (25%) y controles de compañeros de camada megalina^{f/+} (25%), megalina^{f/+}:gGT-Cre (25%) y megalina^{f/+} (25%). Los ratones con delección de megalina (n=12) pueden identificarse mediante genotipado por PCR del alelo flanqueado por sitios loxP y la gGT-cre recombinasa.

Pueden someterse a prueba mutantes K6 o de tipo natural marcados con Alexa-488 o rodamina (dos marcadores diferentes para evitar la contribución de cargas negativas (Alexa-488) o positiva (rodamina)) mediante inyección i.p. en ratones de 4 semanas de edad y analizarse su circulación usando un microscopio de barrido láser confocal invertido LSM510-META de Zeiss e inmunotransferencias con anticuerpos anti-ser humano. Puesto que la expresión de megalina se limita a epitelios renales proximales, células paratiroides, células epiteliales epididimarias, neumocitos de tipo II, células foliculares tiroideas y epiteliales mamarias, puede investigarse la distribución de tanto Ngal de tipo natural como mutante en ratones de tipo natural y deficientes para explorar la interacción Ngal-megalina *in vivo*. Si la captura de NGAL WT mediante el túbulo proximal se suprime en el riñón de deficiente en megalina condicional, y se excreta Ngal (similar a la figura 10), es probable que la megalina sea el único receptor de Ngal en el riñón y el receptor 24p3R propuesto no sea esencial. Si este es el caso, entonces la distribución de NGAL WT debe correlacionarse también con la distribución de megalina en diferentes tejidos. Además, si mutantes de Ngal tales como K6 tienen una escasa afinidad por megalina, su escape en la orina puede explicarse directamente. Por otro lado, si se captura NGAL WT en el túbulo proximal deficiente en megalina y por células del cuerpo en las que no se expresa megalina, entonces se espera(n) receptor(es) alternativo(s). En este caso, la excreción de Ngal mutante puede ser el resultado de pérdida de afinidad no sólo para megalina, sino para receptores distintos de megalina.

Evaluación de la interacción Ngal:Ent:Fe^{III} en mutantes de Ngal

Ngal se une específicamente a Ent:Fe^{III} y Ent con altas afinidades (0,4 nM y 3,57 nM, respectivamente)^{36,75}, y no puede liberar el hierro unido incluso a bajo pH³⁸. El hierro secuestrado por Ngal ya no participa en reacciones químicas y el complejo es estable para su transporte en circulación. Puede someterse a prueba si los mutantes de pérdida de "reabsorción" tienen todavía la capacidad de unirse a sideróforos férricos a alta afinidad. Los datos iniciales muestran que los mutantes conservan el hierro en presencia de Ent (figura 14) y demuestran una coloración roja definida. La interacción Ngal K6:Ent puede cuantificarse y los efectos estructurales de las mutaciones introducidas pueden determinarse.

Medición cuantitativa de la unión Ent:Fe^{III} mediante Ngal

Puede utilizarse una estrategia de extinción de fluorescencia (FQ) (Nature Chemical Biology, 2010³⁸, figura 10) para cuantificar el espectro de interacciones de Ngal y mutantes de Ngal:sideróforo férrico⁹³⁻⁹⁸ para deducir mediciones de afinidad para la unión a Ent. Pueden recogerse datos de excitación $\lambda_{exc.} = 281$ nm y emisión $\lambda_{em.} = 340$ nm a partir de disoluciones de proteína mutante de Ngal K6 100 nM (con ubiquitina 32 µg/ml y DMSO al 5%), expuestas a Ent:Fe. La sensibilidad al pH del complejo puede determinarse ajustando de manera incremental el pH de la disolución hasta que la señal de fluorescencia se estabiliza. Los datos pueden examinarse usando análisis de regresión no lineal usando un modelo de unión de un sitio (DYNAFIT)⁹⁹. Pueden realizarse experimentos de control para garantizar la estabilidad de proteínas. Las técnicas alternativas incluyen SPR y calorimetría de titulación isotérmica (por ejemplo del grupo de Strong⁸⁶).

Base estructural para la formación de Ngal mutante:Ent:Fe^{III}

Con el fin de confirmar que las mutaciones introducidas para dismantelar la unión a megalina no interfirieran con reconocimiento del ligando de sideróforo férrico, puede determinarse la estructura de K6 ± Ent:Fe^{III} mediante cristalografía de rayos X. Más de 20 estructura cristalinas de Ngal, incluyendo formas humanas, murinas y mutantes, ± CHO unido a N, tanto vacías como unidas a una serie de sideróforos naturales o análogos sintéticos se han determinado previamente (36, 38, 93, 99, 100). Puesto que las mutaciones K6 afectan a los contactos cristalinos en todas las formas cristalinas de Ngal conocidas, esto puede aproximarse como una determinación de la estructura *de novo*. Para la cristalización, la proteína puede estar altamente purificada mediante cromatografía de GST, seguido por filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico, con la pureza y la monodispersidad determinadas mediante PAGE reducida/no reducida y espectroscopía de masas con dispersión de luz estática/dinámica concurrente (SLS/DLS). Pueden examinarse preparaciones de proteínas monodispersas para determinar su capacidad de cristalización usando robótica de submicrolitros y exámenes factoriales disponibles comercialmente. Los cristales preliminares pueden optimizarse en formatos de cristalización convencionales usando metodologías establecidas para catalizar la cristalización. Alternativamente, la proteína pueden purificarse de manera más rigurosa o complejarse con Fab (se determinó la estructura de un complejo de Ngal murino:Fab [cristalizado a partir de PEG 4000 al 20% e isopropanol al 10%, pH = 7,0; grupo espacial: P2₁2₁2₁, a = 37,9 Å, b = 69,4 Å, c = 117,6 Å; d_{min.} = 2,15 Å, R_{fusión} = 0,04], puede usarse un panel de más de 16 Fab de anticuerpo anti-Ngal humana para la cristalización). Pueden recogerse datos de difracción. Los datos pueden reducirse con cualquiera de una variedad de paquetes de software disponibles y pueden calcularse las fases mediante Fourier de diferencia directa (para cristales isomorfos), reemplazo molecular (MR), MAD (generalmente usando selenometionina) o MIRAS (usando cualquiera de una variedad de estrategias de derivatización). Estos datos pueden caracterizar cuantitativamente interacciones Ngal:Ent, indicando si K6 (u otros mutantes) han retenido la afinidad por Ent:Fe^{III}. Estos estudios pueden mostrar que las mutaciones introducidas alteran la unión a ligando, y las estructuras pueden usarse para

diseñar por ingeniería genética mutaciones adicionales.

Excreción segura de hierro mediante el suministro NGAL mutante:Ent:Fe^{III}

- 5 Para someter a prueba si Ngal K6:Ent puede quelar eficazmente y suministrar NTBI a la orina a través del riñón, se introdujo el complejo K6:Ent:⁵⁵Fe^{III} (80 µg) en ratones (4 semanas), y se recogió la orina durante 3 h en jaulas metabólicas. Tal como se muestra en la figura 16, el 23% del complejo K6-⁵⁵Fe^{III} inyectado se suministró a la orina, en paralelo con el porcentaje de proteína K6 encontrada en la orina (figura 13), mientras que se excretó menos del 0,1% del producto inyectado de tipo natural. Sólo se acumularon cantidades traza de ⁵⁵Fe^{III} en el hígado (<1%),
- 10 indicando que una vez que K6:Ent queló el hierro, se suministró principalmente al riñón y a la orina. Basándose en estos resultados, puede someterse a prueba si K6:Ent puede capturar, quelar, hacer circular y eliminar NTBI endógeno.

Quelación y excreción de NTBI por K6:Ent en modelos murinos de hemocromatosis

Establecimiento y evaluación de modelos de ratón

- Un modelo de ratón de hemocromatosis hereditaria de tipo 1 que carece del gen *Hfe* está disponible de Jackson Labs (n.^o de reserva: 003812). Estos ratones desarrollan sobrecarga de hierro en órganos 12 semanas tras el destete⁴⁵. Un modelo de ratón de hemocromatosis adquirida puede establecerse tal como se notificó previamente¹⁰¹. Este modelo de ratón de sobrecarga de hierro mediada por transfusión se realizó transfundiéndolo RBC de ratón almacenados (14 días a 4°C) (200 o 400 µl a 17,0-17,5 g/dl de hemoglobina) a un receptor por medio del plexo retroorbital de ratones anestesiados con isoflurano, que es el equivalente de la transfusión de un ser humano con 1-2 unidades de RBC. En resumen, los RBC se obtienen de 30-50 ratones C57BL/6 en disolución de CPDA-1 (Baxter),
- 25 se sometieron a leucorreducción usando un filtro de reducción de leucocitos de alta eficacia neonatal (PurecellNeo) y luego se concentraron mediante centrifugación hasta un nivel de hemoglobina final de 17 g/dl, tal como se determina mediante ensayos de Drabkin (Ricca)¹⁰² y se comparó la densidad óptica (540 nm) con los patrones Count-a-Part Cyanmethemoglobin Standards (Diagnostic Technology)¹⁰¹. Se cuentan los leucocitos residuales mediante citometría (LeucoCOUNT; BD)¹⁰¹. Se observó previamente NTBI en ratones tanto *HFE*^{-/-} (~3,7 µM)¹⁰³ como
- 30 transfundidos con RBC (~2,5 µM)¹⁰¹. NTBI puede medirse en estos modelos usando un ensayo de ultrafiltración de ácido nitrilotriacético (NTA) convencional¹⁰¹. Esto puede realizarse incubando plasma heparinizado (90 µl) con NTA (800 mM, pH 7,0) y luego preparando un ultrafiltrado de 30K (NanoSep, punto de corte de 30 kDa, tipo de polisulfona) y midiendo NTBI con ferrozina¹⁰⁴. Puede determinarse el hierro orgánico total usando un procedimiento que implica desecación a 65°C, seguido por acidificación y detección de NTBI con un cromógeno (batofenantrolina 1,6 mM)¹⁰⁵. Puede detectarse la hemoglobinemia espectrofotométricamente usando un espectrofotómetro PowerWave XS (BioTek)¹⁰¹. Puede detectar la acumulación de hierro intracelular en el hígado y el bazo en secciones de parafina con reactivo de Perl que revela gránulos azules⁵⁴ y en secciones con inmunotinción conjunta para detectar macrófagos con anticuerpo anti-F4/80 de ratón (eBioscience) y kits de ABC y DAB (Vector Laboratories)¹⁰¹.
- 40 Tal como se notificó anteriormente, varias citocinas/quimiocinas, especialmente interleucina-6 (IL-6), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), proteína inhibidora de macrófagos-1β (MIP-1β) y quimiocina derivada de queratinocitos/CXCL1 (KC/CXCL1) están aumentadas en el plasma 2 h tras la transfusión de RBC almacenados antiguos¹⁰¹. Por tanto, estas citocinas pueden medirse como marcadores de sobrecarga de hierro y como una medida de la eficacia del tratamiento de Ngal. Las citocinas/quimiocinas pueden cuantificarse usando el kit de matriz de perlas citométricas Flex (BD Biosciences) y plasma con un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) equipado con el software FlowJo¹⁰¹.

Tratamiento de sobrecarga de hierro con K6:Ent y evaluación de la eficacia del tratamiento.

- 50 El complejo K6:Ent puede introducirse en ratones *HFE*^{-/-} o transfundidos con RBC mediante infusión intravenosa con una bomba microsmótica (ALZET®). Para ratones *HFE*^{-/-}, la dosis de K6:Ent puede ser de 17,9 mg de K6:Ent durante 12 horas, 3 veces a la semana durante 4 semanas. Esta dosis se basa en el siguiente cálculo: Para ratones *HFE*^{-/-}, NTBI es ~3,7 µM y el volumen de sangre ~ 1,6 ml; para maximizar la quelación y eliminación de hierro, deben
- 55 estar presentes continuamente los mismos moles de Ngal:Ent en la circulación durante un tratamiento de 12 horas con la consideración de la semivida de Ngal de 10 min, o aproximadamente ~0,85 µmoles (~17,9 mg) de Ngal:Ent que se requieren teóricamente a lo largo de 12 horas. De manera similar, para los ratones con transfusión la dosis es de ~0,58 µmoles (~12 mg) de Ngal:Ent a lo largo de 12 horas en un único período de tratamiento. Apo-K6 es como un control negativo porque no se une a hierro y disociaría los catecoles endógenos asociados. NGAL WT es también un control útil porque la captura la megalina, y no hace circular hierro a la orina.
- 60

- La eficacia de tratamiento puede evaluarse mediante la medición de hierro sérico y urinario, la concentración de hierro en el hígado, el bazo y el riñón, la acumulación de hierro intracelular en macrófagos y hepatocitos, y citocinas/quimiocinas en el plasma de ratones tratados con K6:Ent frente a tratados con K6 o de tipo natural tal como se describió anteriormente. Ngal K6 puede detectarse en la orina mediante inmunotransferencia con anticuerpos
- 65

anti-ser humano. Los datos preliminares sugieren que K6 aparecerá en la orina, y que K6:Ent disminuirá notablemente NTBI sérico, disminuirá el contenido de hierro de ratones *HFE*^{-/-} y la sobrecarga por transfusión, y adicionalmente normalizará los niveles de citocinas/quimiocinas en transfusiones con RBC antiguos.

5 Efecto del tratamiento con K6:Ent sobre el daño celular mediado por hierro

La medición de la actividad redox en los lípidos peroxidados del riñón es un marcador del estrés oxidante catalizado por hierro, que se mide mediante malondialdehído. Se separa la corteza renal de ratones sometidos a tratamiento con K6 de la médula, se homogeneiza^{106,107} y se trata con TCA y ácido tiobarbitúrico y se lee el sobrenadante a 535 nm. Se calcula el malondialdehído, expresado en nmoles, usando un coeficiente de extinción molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 535 nm. Una medición adicional del daño renal durante el tratamiento con K6 es la detección de uNgal de ratón endógena (25 KDa) con anticuerpo frente a ratón (R&D Systems). Ngal se expresa en el plazo de 3 h del daño mediante estímulos que provocan AKI incluyendo ataque radical, y en el presente documento se medirá uNgal en los diferentes grupos de tratamiento.

15 Medición de hierro libre y actividad redox en orina de ratón

Los datos presentados en el presente documento sugieren que el hierro se unirá fuertemente a Ngal K6 y será inactivo redox incluso en la orina ácida. Esto puede someterse a prueba usando la prueba de bleomicina espectrofotométrica clásica de Gutteridge⁵⁷ para medir el hierro "catalítico" urinario en ratones tratados con K6, K6:Ent y NGAL de tipo natural. Se recoge orina en agua libre de pirógenos, tratada con Chelex y se crea un ultrafiltrado usando instrumento Microcon 10K (Millipore), medido con los ensayos de bleomicina. Se prepara una curva patrón con adiciones conocidas en la orina de FeCl₃ y hierro detectable con bleomicina registradas por mg de creatinina (Abeam). También puede usarse una segunda estrategia para medir la actividad redox -la generación de radicales hidroxilo mediada por hierro puede detectarse mediante la conversión de 3'-(p-hidroxifenil)fluoresceína (HPF; Invitrogen) en fluoresceína en presencia de ácido ascórbico⁹⁴ (ex. 490 nm, em. 515 nm). Tal como se muestra en la figura 12, NGAL de tipo natural extinguió la actividad de catecol:Fe^{III} -se somete a prueba orina de ratones tratados con K6, K6:Ent y NGAL WT:Ent. Un control positivo es Ent/catecol:Fe^{III} seguido por K6 que inhibe la producción de radicales superóxido.

30 Lista de referencia

1. Hershko, C., y Peto, T.E. Non-transferrin plasma iron. Br. J. Haematol. 66: 149-151, 1987.
- 35 2. Breuer, W., Ronson, A., Slotki, I.N., Abramov, A., Hershko, C., y Cabantchik, Z.I. The assessment of serum nontransferrin-bound iron in chelation therapy and iron supplementation. Blood. 95: 2975-2982, 2000.
3. Andrews, N.C. Iron metabolism: Iron Deficiency and Iron Overload. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 1:75-98, 2000.
- 40 4. Thakerngpol, K., Fucharoen, S., Boonyaphipat, P., Srisook, K., Sahaphong, S., Vathanophas, V., y Stitnimankarn, T. Liver injury due to iron overload in thalassemia: histopathologic and ultrastructural studies. Biometals. 9: 177-183, 1996.
- 45 5. Conte, D., Piperno, A., Mandelli, C., *et al.* Clinical, biochemical and histological features of primary haemochromatosis: a report of 67 cases. Liver. 6: 310-315, 1986.
6. Tsukamoto, H., Home, W., Kamimura, S., Niemela, O., Parkkila, S., Yla-Herttuala, S., y Brittenham, G. M. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. J. Clin. Invest. 96: 620-630, 1995.
- 50 7. Berdoukas, V., Bohane, T., Tobias, V., *et al.* Liver iron concentration and fibrosis in a cohort of transfusion-dependent patients on long-term desferrioxamine therapy. Hematol. J.5: 572-578, 2004.
8. Liu, P., y Olivieri, N. Iron overload cardiomyopathies: new insights into an old disease. Cardiovasc. Drugs. Ther. 8: 101-110, 1994.
- 55 9. Buja, L.M., y Roberts, W.C. Iron in the heart. Etiology and clinical significance. Am. J. Med. 51: 209-221, 1971.
10. Schwartz, K.A., Li, Z., Schwartz, D.E., *et al.* Earliest cardiac toxicity induced by iron overload selectively inhibits electrical conduction. J. Appl. Physiol. 93: 746-751, 2002.
- 60 11. Oudit, G.Y., Trivieri, M.G., Khaper, N., Liu, P.P., y Backx, P.H. Role of L-type Ca²⁺ channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy. J. Mol. Med. 84: 349-364, 2006.
- 65 12. Oudit, G.Y., Sun, H., Trivieri, M.G., Koch, S.E., Dawood, F., Ackerley, C., Yazdanpanah, M., Wilson, G.J., Schwartz, A., Liu, P.P., y Backx, P.H. L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into

cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy, *Nat. Med.* 9: 1187-1194, 2003.

13. Andrews, N.C. Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* 341: 1986-1995, 1999.

5 14. Argyropoulou, M.I., y Astrakas, L. MRI evaluation of tissue iron burden in patients with beta-thalassaemia major. *Pediatr. Radiol.* 37: 1191-1200, 2007.

10 15. Argyropoulou, M.I., Kiortsis, D.N., Astrakas, L., Metafratzi, Z., Chalissos, N., Efremidis, S.C. Liver, bone marrow, pancreas and pituitary gland iron overload in young and adult thalassemic patients: a T2 relaxometry study. *Eur. Radiol.* 17: 3025-3030, 2007.

16. Cunningham, M.J., Macklin, E.A., Neufeld, E.J., y Cohen, A.R. Complications of beta-thalassemia major in North America. *Blood.* 104: 34-39, 2004.

15 17. Fung, E., Harmatz, P.R., Lee, P.D., Milet, M., Bellevue, R., Jeng, M.R., Kalinyak, K.A., Hudes, M., Bhatia, S., y Vichinsky, E.P. Increased prevalence of iron-overload associated endocrinopathy in thalassaemia versus sickle-cell disease. *Br. J. Haematol.* 135: 574-582, 2006.

20 18. Kattamis, C., y Kattamis, A.C. Management of thalassemias: growth and development, hormone substitution, vitamin supplementation, and vaccination. *Semin. Hematol.* 32: 269-279, 1995.

19. Eschbach, J.W., y Adamson, J.W. Iron overload in renal failure patients: Changes since the introduction of erythropoietin therapy. *Kidney Int.* 55: S35-S43, 1999.

25 20. Lorenz, M., Kletzmayer, J., Huber, A., Hörl, A.H., Sunder-Plassmann, G., y Födinger, M. Iron overload in kidney transplants: Prospective analysis of biochemical and genetic markers. *Kidney Int.* 67, 691-697, 2005.

30 21. Mandalunis, P.M., y Ubios, A.M. Experimental Renal Failure and Iron Overload: A Histomorphometric Study in Rat Tibia. *Toxicol. Pathol.* 33: 398-403, 2005.

22. Karnon, J., Zeuner, D., Brown, J., Ades, A.E., Wonke, B., y Modell, B. Lifetime treatment costs of beta-thalassaemia major. *Clin. Lab. Haematol.* 21: 377-385, 1999.

35 23. Darbari, D.S., Kple-Faget, P., Kwagyan, J., Rana, S., Gordeuk, V.R., y Castro, O. Circumstances of death in adult sickle cell disease patients. *Am. J. Hematol.* 81: 858-863, 2006.

24. McCord, J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 312: 159-163, 1985.

40 25. Meneghini, R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 23: 783-792, 1997.

26. Kalinowski, D.S., y Richardson, D.R. The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer. *Pharmacol. Rev.* 57: 547-583, 2005.

45 27. Cohen, A.R. New Advances in Iron Chelation Therapy. *Hematology-American Hematology Society Hematology Education Program.* 42-47, 2006.

28. Hoffbrand, A.V., Cohen, A., y Herskho, C. Role of deferiprone in chelation therapy for transfusional iron overload. *Blood* 102: 17-24, 2003.

50 29. Bosque, M.A., Domingo, J.L., y Corbella, J. Assessment of the developmental toxicity of deferoxamine in mice. *Arch. Toxicol.* 69: 467-471, 1995.

55 30. Oliveri, N.F., Buncic, J.R., Chew, E., Galant, T., Harrison R. V., Keenan, N., Logan, W., Mitchell, D., Rici, G., Skarf, B., Taylor, M., y Freedman, M.H. Visual and auditory neurotoxicity in patients receiving subcutaneous deferoxamine infusions. *N. Engl. J. Med.* 314: 869-873, 1986.

31. Boelaert, J.R., y de Locht, M. Side-effects of desferrioxamine in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 8: S43-S46, 1993.

60 32. Windus DW, Stokes TJ, Julian BA, Fenves AZ. Fatal *Rhizopus* infections in hemodialysis patients receiving deferoxamine. *Ann. Intern. Med.* 107: 678-80, 1987.

65 33. Kowdley, K.V., y Kapla, M.M. Iron-chelation therapy with oral deferiprone--Toxicity or Lack of Efficacy? *N. Engl. J. Med.* 339: 468-469, 1998.

34. Kontoghiorghes, G.J. "Deferasirox: Uncertain future following renal failure fatalities, agranulocytosis and other

toxicities. *Expert. Opin. Drug. Saf.* 6:235-239, 2007.

35. Yang, J., Goetz, D., Li, J.Y., Wang, W., Mori, K., Setlik, D., Du, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Strong R., y Barasch, J. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol. cell*, 10: 1045-56, 2002.

36. Goetz, D.H., Holmes, M.A., Borregaard, N., Bluhm, M.E., Raymond, K.N., y Strong, R.K. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol. cell*, 10: 1033-1043, 2002.

37. Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodríguez, D.J., Holmes, M.A., y Strong, R.K., Akira, S., y Aderem, A. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*, 432: 917-921, 2004.

38. Bao, G., Clifton, M., Hoette, T.M., Mori, K., Deng, S.X., Qiu, A., Viltard, M., Williams, D., Paragas, N., Leete, T., Kulkarni, R., Li, X., Lee, B., Kalandadze, A., Ratner, A.J., Pizarro, J.C., Schmidt-Ott, K., Landry, D.W., Raymond, K.N., Strong, R.K., y Barasch, J. Iron Traffics in Circulation Bound to a Siderocalin (Ngal)-Catechol Complex. *Nat. Chem. Biol.* en prensa, 2010.

39. Mishra, J., Ma, Q., Prada, A., Mitsnefes, M., Zahedi, K., Yang, J., Barasch, J., y Devarajan, P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: 2534-43, 2003.

40. Mori, K., Lee, H.T., Rapoport, D., Drexler, I.R., Foster, K., Yang, J., Schmidt-Ott, K.M., Chen, X., Li, J.Y., Weiss, S., Mishra, J., Cheema, F.H., Markowitz, G., Suganami, T., Sawai, K., Mukoyama, M., Kunis, C., D'Agati, V., Devarajan, P., y Barasch, J. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 115: 610-621, 2005.

41. Mishra, J., Dent, C., Tarabishi, R., Mitsnefes, M.M., Ma, Q., Kelly, C., Ruff, S.M., Zahedi, K., Shao, M., Bean, J., Mori, K., Barasch, J., y Devarajan, P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*. 365: 1231-1238, 2005.

42. Nickolas, T.L., O'Rourke, M.J., Yang, J., Sise, M.E., Canetta, P.A., Barasch, N., Buchen, C., Khan, F., Mori, K., Giglio, J., Devarajan, P., y Barasch, J. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann. Intern. Med.* 148: 810-9, 2008.

43. Hvidberg, V., Jacobsen, C., Strong, R.K., Cowland, J.B., Moestrup, S.K., y Borregaard, N. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake, *FEBS Letters* 579: 773-777, 2005.

44. Andrews, N.C. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat. Rev.* 1: 208-217, 2000.

45. Bahram, S., Gilfillan, S., Kuhn, L.C., Moret, R., Schulze, J.B., Lebeau, A., y Schumann, K. Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 13312-13317, 1999.

46. Borwein, S., Ghent, C.N., y Valberg, L.S. Diagnostic efficacy of screening tests for hereditary hemochromatosis. *Gen. Med. Assoc.* 131: 895-901, 1984.

47. Halliwell, B., y Gutteridge, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85, 1990.

48. Trinder, D., Fox, C., Vautier, G., y Olynyk, J.K. Molecular pathogenesis of iron overload, *Gut* 51: 290-295, 2002.

49. Allen, K.J., Gurrin, L.C., Constantine, C.C., Osborne, N.J., Delatycki, M.B., Nicoll, A.J., McLaren, C.E., Bahlo, M., Nisselle, A.E., Vulpe, C.D., Anderson, G.J., Southey, M.C., Giles, G.G., English, D.R., Hopper, J.L., Olynyk, J.K., Powell, L.W., y Gertig, D.M. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N. Engl. J. Med.* 358: 221-230, 2008.

50. Landro, L. New rules may shrink ranks of blood donors. *Wall Street Journal*. 2007-01-10.

51. Bennett, J.M. (ed). *The Myelodysplastic Syndromes: Pathobiology and Clinical Management*. Nueva York: Marcel Dekker, Inc. 2002.

52. Iron Disorders Institute, Inc. Transfusion-dependent iron overload. *idInsight*. Greenville, SC.

53. Schafer, A., Cheron, R.G., Dluhy, R., Cooper, B., Gleason, R.E., Soeldner, J.S., y Bunn, H.F. Clinical

consequences of acquired transfusional iron overload in adults. *N. Engl. J. Med.* 304: 319-324, 1981.

54. Paragas, N., Nickolas, T.L., Wyatt, C., Forster, C.S., Sise, M., Morgello, S., Jagla, B., Buchen, C., Stella, P., Sanna-Cherchi, S., Carnevali, M.L., Mattei, S., Bovino, A., Argentiero, L., Magnano, A., Devarajan, P., Schmidt-Ott, K.M., Allegri, L., Klotman, P., D'Agati, V., Gharavi, A.G., i Barasch, J. Urinary NGAL marks cystic disease in HIV-associated nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20: 1687-1692, 2009.
55. Alfrey, A. Toxicity of tubule fluid iron in nephrotic syndrome. *Am. J. Physiol.* 263: F637-641, 1992.
- 10 56. Baliga, R., Zhang, Z., Baliga, M., y Shah, S.V. Evidence for cytochrome P-450 as a source of catalytic iron in myoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int.* 49: 362-369, 1996.
57. Baliga, R., Zhang, Z., Baliga, M., Ueda, N., y Shah, S.V. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* 53: 394-401, 1998.
- 15 58. Saad, S.Y., Najjar, T.A., y Al-Rikabi, A.C. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol. Res.* 43: 211-218, 2001.
59. Paller, M.S., y Jacob, H.S. Cytochrome P-450 mediates tissue-damaging hydroxyl radical formation during reoxygenation of the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 7002-7006, 1994.
- 20 60. Baliga, R., Ueda, N., y Shah, S.V. Increase in bleomycin-detectable iron in ischaemia/reperfusion injury to rat kidneys. *Biochem. J.* 291: 901-905, 1993.
61. Baron, P., Gómez-Marín, O., Casas, C., Heil, J., Will, N., Condie, R., Burke, B., Najarian, J.S., y Sutherland, D.E. Renal preservation after warm ischemia using oxygen free radical scavengers to prevent reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 51: 60-65. 1991.
- 25 62. Wu, Z.L., y Paller, M.S. Iron loading enhances susceptibility to renal ischemia in rats. *Ren. Fail.* 16: 471-480, 1994.
- 30 63. Baliga, R., Zhang, Z., Baliga, M., Ueda, N., y Shah, S.V. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* 53: 394-401, 1998.
64. Walker, P.D., y Shah, S.V. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J. Clin. Invest.* 81: 334-341, 1988.
- 35 65. Paller, M.S., y Hedlund, B.E. Role of iron in postischemic renal injury in the rat. *Kidney Int.* 34: 474-480, 1988.
66. Paller, M.S., y Hedlund, B.E. Extracellular iron chelators protect kidney cells from hypoxia/reoxygenation. *Free Radic. Biol. Med.* 17: 597-603, 1994.
- 40 67. de Vries, B., Walter, S.J., von Bonsdorff, L., Wolfs, T.G., van Heurn, L.W., Parkkinen, J., y Buurman, W.A. Reduction of circulating redox-active iron by apotransferrin protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*, 77: 669-675, 2004.
- 45 68. Zager, R.A., Burkhart, K.M., Conrad, D.S., y Gmur, D.J. Iron, heme oxygenase, and glutathione: effect on myohemoglobinuric proximal tubular injury. *Kidney Int.* 48: 1624-1634, 1995.
69. Paller, M.S., y Hedlund, B.E. Extracellular iron chelators protect kidney cells from hypoxia/reoxygenation. *Free Radic. Biol. Med.* 17: 597-603, 1994.
- 50 70. Holmes, M.A., Paulsene, W., Jide, X., Ratledge, C., y Strong, R.K. Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure* 13: 29-41, 2005.
- 55 71. Loomis, L.D., y Raymond, K.N. Solution Equilibria of Enterobactin and Metal-Enterobactin Complexes. *Inorg. Chem.* 30: 906-911, 1991.
72. Jewett, S.L., Egging, S., y Geller, L. Novel method to examine the formation of unstable 2:1 and 3:1 complexes of catecholamines and iron(III), *J. Inorg. Biochem.* 66: 165-173, 1997.
- 60 73. Keberle, H. The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 119: 758-768, 1964.
- 65 74. Leheste, J.R. *et al.* Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am. J. Pathol.*

155: 1361-1370, 1999.

75. Abergel, R.J., Wilson, M.K., Arceneaux, J.E.L, Hoette, T.M., Strong, R.K., Byers, B.R., y Raymond, K.N. Anthrax pathogen evades the mammalian immune system through stealth siderophore production. PNAS 103: 18499-18503, 2006.
76. Devireddy, L.R., Gazin, C., Zhu, X., y Green, M.R. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. Cell. 123: 1293-305, 2005.
77. Moestrup, S.K., y Verroust, P.J. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. Annu. Rev. Nutr. 21: 407-428, 2001.
78. Liang, M.P., Banatao, D.R., Klein, T.E., Brutlag, D.L., y Altman, R.B. WebFEATURE: An interactive web tool for identifying and visualizing functional sites on macromolecular structures. Nucleic Acids Res. 31: 3324-3327, 2003.
79. Moestrup, S.K. y Gliemann, J. Analysis of ligand recognition by the purified alpha 2-macroglobulin receptor (low density lipoprotein receptor-related protein). Evidence that high affinity of alpha 2-macroglobulin-proteinase complex is achieved by binding to adjacent receptors. J. Biol. Chem. 266: 14011-14017, 1991.
80. Kaiser, B. K., Barahmand-Pour, F., Paulsene, W., Medley, S., Geraghty, D. E., y Strong, R. K., Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. J. Immunol. 174: 2878-2884, 2005.
81. Li, P., McDermott, G., y Strong, R. K., Crystal structures of RAE-1beta and its complex with the activating immunoreceptor NKG2D. Immunity, 16: 77-86, 2002.
82. Li, P., Morris, D. L., Willcox, B. E., Steinle, A., Spies, T., y Strong, R. K., Complex Structure of the Activating Immunoreceptor NKG2D and its MHC Class I-like Ligand MICA. Nature Immunol. 2: 443 - 451, 2001.
83. McBeth, C., Seamons, A., Pizarro, J. C., Fleishman, S. J., Baker, D., Kortemme, T., Gorman, J. M., y Strong, R. K., A new twist in TCR diversity revealed by a forbidden alphabeta TCR. J. Mol. Biol. 375: 1306-1319, 2008.
84. McFarland, B. J., y Strong, R. K. Thermodynamic analysis of degenerate recognition by the NKG2D immunoreceptor: not induced fit but rigid adaptation. Immunity 19: 803-812, 2003.
85. Vigdorovich, V., Strong, R. K., y Miller, A. D., Expression and characterization of a soluble, active form of the jaagsiekte sheep retrovirus receptor, Hyal2. J. Virol. 79: 79-86, 2005.
86. Xu, H., Song, L., Kim, M., Holmes, M. A., Kraft, Z., Sellhorn, G., Reinherz, E. L., Stamatatos, L., y Strong, R. K. Interactions between lipids and human anti-HIV antibody 4E10 can be reduced without ablating neutralizing activity. J. Virol. 84: 1076-1088, 2010.
87. Correia, B.E., Ban, Y.E.A., Holmes, M.A., Xu, H., Ellingson, K., Kraft, Z., Carrico, C., Boni, E., Sather, N., Zenobia, C., Burke, K.Y., Bradley-Hewitt, T., Bruhn-Johannsen, J.F., Kalyuzhnyi, O., Baker, D., Strong, R.K., Stamatatos, L., y Schief, W.R. Computational design of epitope-scaffolds allows induction of antibodies specific for a poorly immunogenic HIV vaccine epitope. Structure, in press, 2010.
88. Strong, R.K., Bratt, T., Cowland, J.B., Borregaard, N., Wiberg, F.C., y Ewald, A.J., Expression, purification, crystallization and crystallographic characterization of dimeric and monomeric human neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL). Acta Cryst. D54: 93-95, 1998.
89. Bauer, S., Willie, S.T., Spies, T., y Strong, R.K. Expression, purification, crystallization and crystallographic characterization of the human MHC class I related protein MICA. Acta Cryst.D54: 451-453, 1998.
90. Ryan, M.J., *et al.* HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. Kidney Int. 45: 48-57, 1994.
91. Leheste, J.R., Melsen, F., Wellner, M., Jansen, P., Schlichting, U., Renner-Muller, I., Andreassen, T.T., Wolf, E., Bachmann, S., Nykjaer, A., y Willnow, T.E. Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. FASEB J. 17: 247-249, 2003.
92. Dworniczak, B., Skryabin, B., Tchinda, J., Heuck, S., Seesing, F.J., Metzger, D., Chambon, P., Horst, J., Pennenkamp, P. Inducible Cre/loxP Recombination in the Mouse Proximal Tubule. Nephron Experimental Nephrology, 106: e11-e20, 2007.
93. Abergel, R.J., Clifton, M.C., Pizarro, J.C., Warner, J.A., Shuh, D.K., Strong, R.K., y Raymond, K.N., The

siderocalin/enterobactin interaction: a link between mammalian immunity and bacterial iron transport. J. Am. Chem. Soc. 130: 11524-34, 2008.

94. Abergel, R.J., Moore, E.G., Strong, R.K., y Raymond, K.N., Microbial evasion of the immune system: structural modifications of enterobactin impair siderocalin recognition. J. Am. Chem. Soc. 128: 10998-9, 2006.

95. Abergel, R.J., Wilson, M.K., Arceneaux, J.E., Hoette, T.M., Strong, R.K., Byers, B.R., y Raymond, K.N. Anthrax pathogen evades the mammalian immune system through stealth siderophore production. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 18499-503, 2006.

96. Fischbach, M.A., Lin, H., Zhou, L., Yu, Y., Abergel, R.J., Liu, D.R., Raymond, K.N., Wanner, B.L., Strong, R.K., Walsh, C.T., Aderem, A., y Smith, K.D. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 16502-7, 2006.

97. Hoette, T.M., Abergel, R.J., Xu, J., Strong, R.K., y Raymond, K.N. The role of electrostatics in siderophore recognition by the immunoprotein Siderocalin. J. Am. Chem. Soc. 130: 17584-92, 2008.

98. Goetz, D.H., Willie, S.T., Armen, R.S., Bratt, T., Borregaard, N., y Strong, R.K. Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. Biochemistry, 39: 1935-41, 2000.

99. Kerjaschkit, D., Orlando, R.A., Farquhar, M.G., y Kuzmic, P. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. Anal. Biochem. 237: 260-273, 1996.

100. Holmes, M.A., Paulsene, W., Jide, X., Ratledge, C., y Strong, R.K. Siderocalin (Lcn 2) Also Binds Carboxymycobactins, Potentially Defending against Mycobacterial Infections through Iron Sequestration. Structure, 13: 29-41, 2005.

101. Hod, E.A., Zhang, N., Sokol, S.A., Wojczyk, B.S., Francis, R.O., Ansaldi, D., Francis, K.P., Della-Latta, P., Whittier, S., Sheth, S., Hendrickson, J.E., Zimring, J.C., Brittenham, G.M., y Spitalnik, S.L. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. Blood. 115: 4284-4292, 2010.

102. Moore, G.L., Ledford, M.E., y Merydith, A. A micromodification of the Drabkin hemoglobin assay for measuring plasma hemoglobin in the range of 5 to 2000 mg/dl. Biochem. Med. 26: 167-173, 1981.

103. Anita, C., Chua, G., Olynyk, J.K., Leedman, P.J., y Trinder, D. Nontransferrin-bound iron uptake by hepatocytes is increased in the Hfe knockout mouse model of hereditary hemochromatosis. Blood. 104: 1519-1525, 2004.

104. Evans, R.W., Rafique, R., Zarea, A., *et al.* Nature of non-transferrin-bound iron: studies on iron citrate complexes and thalassemic sera. J. Biol. Inorg. Chem. 13: 57-74, 2008.

105. Overmoyer, B.A., McLaren, C.E., y Brittenham, G.M. Uniformity of liver density and nonheme (storage) iron distribution. Arch. Pathol. Lab. Med. 111: 549-554, 1987.

106. Walker, P.D., y Shah, S. V gentamicin-induced acute renal failure in rats. J. Clin. Invest. 81: 334-341, 1988.

107. Paller, M.S., y Hedlund, B.E. Role of iron in postischemic renal injury in the rat. Kidney Int. 34: 474-480. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in, 1998.

La tabla 2 muestra una lista de secuencias de aminoácidos, y las secuencias de aminoácidos de proteínas NGAL mutantes. SEQ ID NO: 2-5 forman parte de la invención, los otros mutantes de NGAL son para fines comparativos sólo. Las proteínas NGAL mutantes que se generaron se muestran como SEQ ID NO: 2-10; 21-68; 247-251. La tabla 2 también muestra supuestas proteínas NGAL mutantes que tienen sustituciones en aminoácidos no cargados positivamente en todas las posiciones en NGAL (SEQ ID NO: 69-246, incluyendo todos los residuos de superficie en NGAL, residuos de superficie que incluyen las posiciones 1-15 (SEQ ID NO: 69-83), las posiciones 17-26 (SEQ ID NO: 85-94), las posiciones 40-50 (SEQ ID NO: 108-118), las posiciones 57-62 (SEQ ID NO: 125-130), las posiciones 71-82 (SEQ ID NO: 139-150), las posiciones 84-89 (SEQ ID NO: 152-157), las posiciones 96-105 (SEQ ID NO: 164-173), las posiciones 114-118 (SEQ ID NO: 182-186), las posiciones 128-131 (SEQ ID NO: 196-199), la posición 134 (SEQ ID NO: 202), las posiciones 140-151 (SEQ ID NO: 208-219), las posiciones 157-165 (SEQ ID NO: 225-233), las posiciones 170-174 (SEQ ID NO: 238-242).

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
-----------	--------	-----------

ES 2 667 066 T3

SEQ ID NO: 1	NGAL WT	QDSTSDLIAPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNQREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 2	K-3	QDSTSDLIAPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVSNQREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENNVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 3	K-2	QDSTSDLIAPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVSNQREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENNVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 4	I-3	QDSTSDLIAPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNQREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 5	I-1	QDSTSDLIAPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNQREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 6	K-5	QDSTSDLIAPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVSNQREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENNVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 7	K-1	QDSTSDLIAPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELQEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVSNQREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENNVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 8	F-4	QDSTSDLIAPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNQREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 9	F-5	QDSTSDLIAPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNQREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENNVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 10	B-2	QDSTSDLIAPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVSNQREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENNVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 11	<i>Ec</i> NGAL	RDPAPKLIPAPPLDRVPLQPDFKDDQFQGKQWYVVGAGNAFKKEEQGF TMYTTTYELKEDHSYNVTSTLLRDQNCQHWIRTFIPSSQPGQFNLGDIK RYFGVQSYIVRVADTDYNQFAIVFFFRKVYKNQYEFKTTLYRRKELTPE LREKFISFAKSLGLTDDHIFFPVPIDQCIDEE
SEQ ID NO: 12	<i>C</i> NGAL	QDSTPSLIAPAPPLKVPLQPDFQHDQFQGKQWYVIGIAGNILLKKEGHGQL KMYTTTYELKDDQSYNVTSTLLRNERCDYWNDRDFVPSFQPGQFSLGDIQ LYPGVQSYLVQVATNYNQYALVYFRKVYSQYEFKTTLYGRKELPLE LKKEFIRFAKSIGLTEDHIFFPVPIDQCIDE
SEQ ID NO: 13	<i>Ss</i> NGAL	QGTIPNWIPAPPLSKVPLQPNFQADQFQGKQWYVVLGNNAVKKKEEQGRF KMYTTTYELKEDGSYNVTSTLLRGQLCDNWIRTFVPSLQPGQFNLGDIK KYSGLQSYVVRVSTNYSQFAIVFFKKVSNNQYEFKTTLYGRKVLSP LKENFVRFAKSLGLSDDNIFFPVAIDQCIDGQ
SEQ ID NO: 14	<i>P</i> NGAL	QDSTSDLIAPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGRQPGFETLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNQREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 15	MamNGAL	QDSSSDLIAPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGSGNAVGRKDEAPL KMYATIYELKEDKSYNVTSTILFRKEKCDYWIRTFVPGSQPGFETLGNIQ NHPGLTSYVVRVSTNYQYAMVFFKKVSNQKEYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFSVPIDQCING

SEQ ID NO: 16	BtNGAL	RSSSSRLLRAPPLSRIPLQPNFQADQFQGKWTYVGVAGNAIKKEEQDPL KMYSSNYELKEDGSYNVTSILLKDDLCDYWIRTFVPSSQPGQFTLGNIK SYRGIRSYTVRVVNTDYNQFAIVYFKKVQRKKTYFKITLYGRTKELTPE VRENFINFAKSLGLTDDHIVFTVPIDRCIDDQ
SEQ ID NO: 17	MmNGAL	QDSTQNLIPAPSLTVPPLQPDFRSDQFRGRWYVVGLAGNAVQKKTEGSF TMYSTIYELQENNSYNVTSILVRDQDQGCYRWTFTVPSSRAGQFTLGNI MHRYPQVQSYNVQVATTDYNQFAMVFFRKTSENKQYFKITLYGRTKELS PELKERFTRFAKSLGLKDDNIIFSVPDQCIDN
SEQ ID NO: 18	RnNGAL	QDSTQNLIPAPPLISVPLQPGFWTERFQGRWFVVGLAGNAVQKERQSRF TMYSTIYELQEDNSYNVTSILVRGQGCYRWTFTVPSSRPGQFTLGNIH SYPQIQSYDVQVADTDYDQFAMVFFQKTSENKQYFKVTLYGRTKGLSDE LKERFVVSFAKSLGLKDDNIVFSVPDQCIDN
SEQ ID NO: 19	Megalina Hs	MDRGPAAVACTLLALVACLAPASGQECDSAHRFCGSGHCIPADWRCDG TKDCSDDADEIGCAVVTCTQGYFKCQSEGQCIPNSWVCDQDQDCDDGSD ERQDCSQSTCSSHQITCSNGQCIPSEYRCDHVRDCPDGADENDCQYPTC EQLTCDNGACYNTSQKCDWKVDCRDSSDEINTEICLHNEFSCNGECI PRAYVCDHDNDQDGSDEHACNYPTCGGYQFTCPSGRCIYQNVCDGED DCKDNGDEDEGCESGPHDVHKCSPREWSCEPSGRCISYKVCIDGILDCPG REDENNTSTGKYCSMTLCSALNCQYQCHETPYGGACFCPPGYIINHNS RTCVEFDCCQIWGICDQKCESRPGRHLCHCEEGYILERGQYCKANDSFG EASIIIFSNGRDLLIGDIHGRSFRILVESQNRGVAVGVAFHYHLQRVFWT DTVQNKVFSVDINGLNIQEVNVSVETPENLAVDWNKNIYLVETKVN IDMVNLDGSYRVTLITENLGHPRGIAVDPTVGYLFFSDWESLSGEPKLE RAFMDGSNRKDLVKTKLGPAGVTLDMISKRVYVVDSDRFDIETVYDYG IQRKTVVHGGSLIPHPFGVSLFEGQVFFTDWTKMAVLKANKFTETNPQV YYQASLRPGVTYVHSLRQPYATNPCKDNNGGCEQVCVLSHRTDNDGLG FRCKCTFGFQLDTERHCAVQNFLIFSSQVAIRGIPFTLSTQEDVMVP VSGNPSFFVGIDFDAQDSTIFFSDMSKHMIFKQKIDGTGREILAANRVE NVESLAFDWISKNLYWTD SHYKSISVMRLADKTRRTVVQYLLNPRSVV HPFAGYLFFTDWFRPAKIMRAWSDGSHLLPVINTTLGWPNGLAIDWAAS RLYWVDAYFDKIEHSTFDGLDRRLGHIEQMTHPFGLAIFGEHLFFTDW RLGAIIRVRKADGGEMTVIRSGIAYILHLKSYDVNIQTGSNACNQPTH NGDCSHFCFPVPNFQRVCGCPYGMRLASNHLTCEGDPTNEPPTQCGGLF SFPCKNGRCPVNYLLCDGVDDCHDNSDEQLCGTLNNTCSSSAFTCGHGE

		CIPAEWRCDKRNDVCDGSEHNCPHAPASCLDTQYTCDFNEQCISKNWV COTDNDGCGDGSDEKNCNSTETCQPSQFNCFNHRCIDLFSVCDGDKDCVD GSDEVGCVLNCITASQFKCASGDKCIGVTNRCDGVFDCSDNSDEAGCPT3 PPGMCHSDEFCQCEDEGICIPNFWECDGHPDCLYGSDEHNACVPKTCPS YFHCNDGNCIHRWLCDRNDGCGMSDEKDCPTQPFRCPSWQWQCLGHN ICVNLSSVCDGIFDCPNGTDESPLCNGNSCSDFNCGGCTHECVQEPFGAK CLCPGLGFLANDSKTCEDEIDECILGSCSQHCYNMRGSFRCSCDTGYML ESDGRCTCKVTASESLLLIVASQNKIADSVTSQVHNISLVENGSIYIVA VDFDSISGRIFWSDATQGKTWSAFQNGTDRRVVFDSSILLETIAIDWV GRNLYWTDYALETIEVSKIDGSHRTVLISKNLNPRGLALDPRMNEHLL FWSDWGHIIPRIERASMDGSMRTVIVQDKIWFPCGLTIDYPNRLLYTMD YLDYMDFCDYNGHHRQVIASDLIIRHPYALTLEFDSVYWTDRATRVM RANKWHGNGQSVVMYNIQWPLGLVAVHPSKQPKSVNPCAIFSRCSLCLL SSQGPHFYSCVCPSGWST.SPD.LNCLRDDQPFLLTYVRQHTIFGTSTNP3 VKSNDAMVPIAGTCNGLDVEFDDAEQYIYWVENPGEIHRVKTDGTNRTV FASISMVGPSMNALDWISRNLYSTNPRITQSIIEVLT LHGDIRYKTLIA NDGTALGVGFPIGTITVDPARGKLYWSDQGTDSGVPAKIASANMDGTSVK TLFTGNLEHLECVTLDIEEQKLYWAVTGRGVIERGNVDGTDRLMLVHQ L SHPWGIAVEDSFLYYTDEQYEVIERVDKATGANKIVLRDNVFNLRGLQV YHRRNAAESSNGCSNNMNACQICLPVPGGLFSCACATGFKLPNDNRSC SPYNSFIVVSMLSAIRGFSLELSDESETMVPVAGQGRNALEVDVSSG FTYWCDFSSSVASDNAIRRTKPDGSSIMNIVTHGTGENGVRGTAVDWVA GNLYFTNAFVSETLIEVLRINTTYRRVLKVTVDMPRHIVVDPKNRYLF WADYQGRPKIERSFLDCNRTVLVSEGIPTPRGLAVDRSDGYVYVWDD LDIIARIRINGENSEVIRYGSRYPTPYGITVFENSIWVDRNLKKIFQA SKEPENTEPPTVIRDNINWLRDVTIFDKQVQPRSPAENVNNPCLENNGG CSHLCFALPGLHTFKCDCAFGLTQSDGKNCAISTENFLIFALSNSLRSL HLDPENHSPPFQTIINVERTVMSLDYDSVSDRIYFTQNLASGVGQISYAT LSSGIHTPTVIASGIGTADGIAFDWITRRIYYSBYLNQMINSMADGSK RTVIARVPKPRATVLDPCQGYLYWADWDTHAKIERATLGGNFRVPIVNS SLVMPSGLTLDYEEDLLYWVDASLQRERSTLTGVDRVIVNAAVHAFG LTLYGQYIYWTDLTYQRIYRANKYDGSQGIAMTNNLSQPRGINTVVK NQQQCNPNCEQFNGGCSHCAPGPNGAECQCPHEGNWYLANNRKHCIVD NGERCGASSEFTCSNGRCISEEWKCDNDNDGCGDGSDEMESVCALHTCSPT ATTCANGRCVQYGYRCDYNDGCGDGSDEAGCLFRDCNATTEFMCNNRRC IPREFICNGVDNCHDNNTSDEKNCPDRTOQSGYTKCHNSNICIPRVYLC DGDNDGCGDSDENFTYCTHTCSSEFQCASGRCIPQHWCQDETDCFD ASDFPASCGHSRRTCTADDFKCDGGRCTPSEFWICDGDNDGCGDSDENK HQCCNQNCSEDFLCVNDRPPDRRCIPQSNVCDGDVDCDGYDENQNC RRTCSSENEFTCGYGLCIPKIFRCDRHNDCGDYSDERGCLYQTCQNNQFT CQNGRCISKTFVCDENDCGDSDELMLHLCHTPEPTCPPHEFKCDNGRC IEMMLCNHLLDDCLDNSDEKGCINECHDPSISGCDHNCTDTLTSEFYCS CRPGYKLMSSDKRTCVDIDECTEMPFCVCSQKCEVIGSYCKCAPGYLRE PDGKTCRQNSNIEFYLIENRYLRNLITIDGYFYSLEGLDNVVALDF DRVEKRLYIDTQRQVIERMFLNKTNKETIINRLPAAESLAVDWVSRK TYWIDARTDGLFVSDI.NGGHRRMTAQHCVDANKTFCFDNPRGTALHPQY GYLYWADWGHRAIYGRVMDGTNKSVMISTKLEWPNGITIDYNDLLYW ADAHLGYIEYSDLEGHHRHTVYDGAHPHFAITIFEDTYWTDWNTRTV EKGNYDGSNRQTLVNTTHRPFDEHVYHPYRQPIVSNPCGTNNNGCSHL CLIKPGGKGFTCECPDDFRTLQLSGSTYCMPMCSTTQLCANNEKCIPI WWKCDGQKDCSDGSDELALCPQREFCRLGQFQCSGDNCTSPQTLCAHQK CPDGSDEDRLLCENHHCDSNEWQCANKRCIPESWQCDTFNDCEBNSDED SSHACASRTCRPGQFRANGRCIPQAWKCDVDNDGCDHSDPEIEECMSSA HLCDFTEFESCKTNYRCIPKWAYCNGVDDCRKSDAQCEERTCHPVGD FRCKNHHCIPLRWQCDGQNDGCDNSDEENCAPRECTESEFRVCVNOQCIP SRWICDHYNDGCDNSDERDCMERTECHPEYFQCTSGHCVHSELKCDGSAD CLDASDEADCPTRFPDGAQCATMFECKNHVCIPPYWKCDGDDDCGDS DEELELCLDVPCNSPNRFRCDNNRCIYSHEVCNGVDDCGDGTDETEHC RKPTPKPCTEYKCGNGHCIPHIIDNVCDADDCGDSDELGCNKGKERT CAENICEQNCQTLNEGFCISCTAGFETNVFDRTSCLDINECEQFGTGP QHCRNTKGSYECVADGFTSMSDRPGKRCAAEAGSSPLLLLPDNVRIRKY NLSSERFSEYIQDEEYIQAVDYDWDPKDIGLSVVYTYVRGEGSRFGAIK RAYIPNFESGRNNLVQEVDLKLKYVMQPDGIAVDWVGRHIYWSDVKNKR IEVAKLDGRYRKWLISTDLQPAIAVNPKLGLMFWTDWGKEPKIESAW MNGEDRNILVFEDLGWPTGLSIDYLNNDRIYWSDFKEDVIETIKYDGT RRVIAKEAMNPYSLDIFEDQLYWISKEKGEVWKQNKFGQKKKEKTLVVN PWLTOVRIFHQRLRYNKSVPNLCKQICSHLCLLRPGGYSCACPGSSFIE GSTTECDAAIELPINLPPPCRCMHGNCYFDETDLPKCKCPSGYTGKYC EMAFSGKISPGTTAVAVLLTILLIVVIGALAIAGFFHYRRTGSLPALP KLPSLSSLVKPSSENGNGVTRFSGADLNMDIGVSGFGPETADRSMAMSE DFVMEMGKQPIIFENPMYSARDSAVKVVPQPIQVTVSENVDNKNYGSPI PSEIVPETNPTSPAADGTQVTKWNLFRKRSKQTTNFENFIYAQMENEQK ESVAATPPSPSLPAKPKPPSRDPPTYSATEDTFKDTANLVKEDSEV
--	--	---

SEQ ID NO: 20	Megalina <i>Mm</i>	MERGAAAAWMLLLAIAAC LAPVSGQECGSGNFRCDNGYCI PASWRCDG TRDCLDDTDEIGCPPRSCGSGFFLCPAEGTCIPSSWVCDQDKDCSDGAD EQQNCPGTTCSSQQLTCSNGQCVPIEYRCDHVSDCPDGS DERN CYPTC DQLTCANGACYNTSQKCDHKVDCRDSSDEANCTTLC SQKEFQCGSGECI LRAYVCDHDND CEDNSDEHNCNYDTCGGHQFTCSNGQCINQNVCDGDD DCQDSGDEDCESNQRHHTCYPREWACPGSGRCISMDKVCDGVDCPEG EDENNATSGRYCGTGLCSILNCEYQCHQTPYGGECFCPPGHIINSNDSR TCIDFDDCQIWGICDQKCESRQGRHQCLCEEGYILERGQHCKSNSDFS ASII FSNGRDLLVGD LHGRNFRILAESKNRGIVMGVDFHYQKHRVFWTD PMQAKVFSTDINGLNTQEILNVSIDAPENLAVDWINNKLKLYLVETRVNRI DVVNLEGNQRVTLITENLGHPRGIALDPTVGYLFFSDWGSLSGQPKVER AFMDGSRKDLVTTKLGWPAGITL DLVSKRVYWVDSRYDYIETVYDGI QRKTVARGGSLVPHFPFGISLFEHVFFTDWTKMAVMKANKFTDTNPQVY HQSSLTPFGVTVYHALRQPNATNPGGNNGGCAICVLSHRTDNGGLGY RCKCEFGFELDADEHHCVAVKNFLLFSSQTAVRGIPFTLTSTQEDVMVPV TGSPSFFVGI DFDAQHSTIFYSDLSKNIYQQKIDGTGKEVITANRLQN VECLSFDWISRNLYWTDGGSKSVTMKLADKSRRIISNLNPRSI VVH PAAGYMF LSWFRPAKIMRAWSDGSHLMPIVNTSLGWPNGLAIDWSTSR LYWVDAFFDKIEHSNLDGLDRKRLGHVDQMTHPFGLTVFKDNVFLTDWR LGAIIRVRKSDGGDMTVVRGISSIMHV KAYDADLQTGTNYCSQTTHPN GDCSHFCFPVPNFQRVCGCPYGMKLQRDQMTCEGDPAREPPTQCGSSS FPCNNGKCVPSIFRCDGVDDCHDNSDEHQCGALNNTCSSSAFTCVHGGQ CIPGQWRCDKQNDCLDGSDEQNCPTSPSTCPTSTCDNHCIPKEW VCDTNDDCSDGSDEKNCQASGTCHPTQFRCPDHRCISPLYVCDGDKDCV DGSD EAGCVLNTSSSQFKADGSSCINSRYRCDGVYDCKDNSDEAGCPT RPPGMCHPDEFQCGQDGT CIPNTWEC DGHPCDIQGSDEHNGCVPKTCSP SHFLCDNGNCIYNSWVCDGDND CRDMSDEKDCPTQPFHCPSSQWQCPGY SICVNL SALCDGVFDCPNGTDESPLCNQDSC LHFNGGCTHRCIQGPFGA TCVCPIGYQLANDTKTCEDEVNECDIPGFC SQHCVNMRGSFRACADPEYT LESDGRTCKVTASENLLL VVASRDKIIMDNITAHTHNIYSLVQDVSFVV ALDFDSVTGRVFWSDLL EGKTWSAFQNGTDKRVVHDSGLSLTEMIAVDW IGRNIYWTDTLETIEVSKIDGSHRTVLISKNVTKPRGLALDPRMGDNV MFWSDWGHHPRIERASMDGMTRTVIVQEKIYWPCGLSIDYPNRLIYFMD AYLDYIEFCDYDQNRQVIASDLVLHHPHALTLFEDSVFWTDRGTHQV MQANKWHGRNQSVVMYSVPQPLGIIA IHPSRQPSSPNPCASATCSHLCL LSAQEPRHYSCACPSGWNLSDDSVNVCVRGDQPFLISVRENVIFGISLDP EVKSN DAMVPISGIQHGYDVEFDDSEQFIYWVENPGEIHRVKT DGSNRT AFAPLSLLGSSSLGLALDWVSRNIYYTTPASRSIEVLT LRGDTRYGKTLI TNDGTPLGVGFVPGIAVD PARGKLYWSDHGTD SGVPAKIASANMDGTS KILFTGNMEHLEVVTLDIQEQKLYWAVTSRGVIERGNVDGTERMILVHH LAHPWGLVVHGSFLYYSD EQYEVIERVDKSSGSKNVVFRDNIPYLRGLR VYHHRNAADSSNGCSNNPNACQQICLPVPGGMFSCACASGFKLSPDGRS CSPYNSFIVVSM LPAVRGFSLELSDHSEAMVPVAGQGRNV LHADV DVAN GFIYWCDFSSSVRSSNGIRRIKPNGSNFTNIVTYGIGANGIRGVAVDWV AGNLYFTNAFVYETLIEVIRINTTYRRVLLKVSVDMPRHIVVDPKHRYL FWADYGQKPKIERSFLDCTNRTVLVSEGIVTPRGLAVDHDGTGYIYVWDD SLDIIARIHRDGGESQVVRYGSRYP TPYGITVFGESI IWVDRNLRKVFQ
---------------	--------------------	--

		ASKQPGNTDPTVIRDSINLLRDVTIFDEHVQPLSPAELNNNPCLQSNNG GCSHFCEALPELPTPKCGCAFGTLEDDGKNCATSREDFLIYSLNNSLRS LHFDPDQDHNLPFQAIISVEGMAIALDYDRNNRRIFFTQKLNPIRGQISYV NLYSGASSPTILLSNIGVTDGIAFDWINRRIIYSDFSNQTINSMAEDGS NRAVIARVSKPRAIVLDPGRGYMYWTDWGTNAKIERATLGGNFRVPIVN TSLVWPNGLTLDLETDLLYWADASLQKIERSTLTGSNREVVISTAFHSF GLTVYQGQYIYWTDIFYTKKIYRANKYDGSDLIAMTTRLPTQPSGISTVVK TQQQQCSNPCDQFNGGCSHICAPGPNGAECQCPHEGWSYLANDNKYCVV DTGARCNQFQFTCLNGRCISQDWKCDNDNDCGDGSDLPVCAFTCRS TAFTCANGRCVPYHYRCDFYNDGCDNSDEAGCLFRSCNSTTEFTCSNGR CIPLSYVCNGINNCHDNDTSDEKNCPITCQPDFAKQTNNICVPRAFL CDGDNDCGDGSDENPIYCASHTCRSNEFQCVSPHRCIPSYWFCDEADC VDSSEPDTCGHSLSNCSANQFHCNDRGRCISSWVCDGDNDCGDMSEDE QRHHCELQNCSSTEFTCINSRPPNRRICIPQHWVCDGDADCADALDELQN CTMRACSTGEFSCANGRCIRQSFRCDNRNDCGDYSDERGCSYPPCRDDQ FTCQNGQCITKLYVCDEDNDCGDGSDQEHLCHTPEFTCPHPQFRCDNG HCIEMGTVCNHVDDCSDNSDEKGCINECQDSSISHCDHNCTDTITSFY CSCLPGYKLMSDKRKTCDVIDECKETPQLCSQKCEENVIGSYICKCAPGYI REPDGKSCRQNSNIEPYLVFSNRYIIRNLTIDGTSYSLILQGLGNVVAL DFDRVEERLYWIDAEKQI IERMFLNKTNQETIISHRLRAESLAVDWVS RKLYWLDAILDCLFVSDLEGRQRKMLAQHCVDANNTFCFENPRGIVLHP QRGYVYWADWGDHAYIARIGMDGTNKTVIIISTKIEWPNAITIDYTNLL YWADAHLYIEFSDLEGHHRHTVYDGTLPHPFALTIFEDTVFTWDNTR TVEKGNKYDGSGRVVLVNTHTKPFDIHVLHPYRQPIMSNPCATNNGGCS HLCLIKAGGRGFTCECPDDFQTVQLRDRTLCPMPCSSSTQFLCGNNEKCI PIWWKCDGQKDCSDGSDSDLCPHRFQFQCRDGNCTSPQALCNAR QDCADGSDSDRVLCEHHRCEANEWQCANKRCIPEYWQCDSDVDDCLDND EDSHCASRTCRPGQFKCNGRCIPQSWKCDVDNDCGDYSDEPIHECMT AAYNCDNHTEFSCKTNYRCIPQWAVCNGFDDCRDNDSEQGCESVPCHPS GDFRCGNHHCIPLRWKCDGIDDCGDNSEESCVPRECTESEFRCADQQC IPSRWVCDQENDCGDNSEDERDCMKTCHPEHFQCTSGHCVKALACDGR ADCLDASDESACPTFRFNGTYCPAAMFECKNHVCIQSFWICDGENDCVD GSDEEIHLCFNVPCESPQFRCDNSRCIYGHQLCNGVDDCGDGSDEKEE HCRKPTHKPCDTDEYKCSNGNCVSVQHYVCDNVDDCGDLSDETGCNLGEN RTCAEKICEQNCTQLSNGGFICSCRPGFKPSTLDKNSCQDINECEEFGI CPQSCRNSKGSYECFCVDGFKSMSTHYGERCAADGSPPLLLLLENVRIR KYNISSEKFSYLEEEHQAIDYDWDPEGIGLSVYVYTVLSQGSQFGA IKRAYLPDFESGSNNPVREVDLGLKYLMPDGLAVDWVGRHIYWSDAKS QRIEVATLDGRYRKWLIITQLDQPAIAVNPGLGLMFWTDQGLQPKIES AWMNGEHRSVLASANLWPNGLSIDYLNDRYIYWSDESKEDVIESIKYDG TDRRLIINDAMKPFSLDIFEDQLYWAKEKEGEVWRQNKFGKGNKEKLLV VNPWLTQVRIFHQLRYNQSVSNPCKQVCSHLCLLPPGGYSCACPGSD VTGSTVECDAASELPTMPSPCRMHGGSYFDENDLPKCKCSSGYSGE YCEIGLSRGIIPGTTMALLTFAMVIVGALVLVGFHYRKTGSGLLPSL PKLPSLSSLAKPSENGNGVTFRSGADVNMDIGVSPFGPETIIDRSMAMN EQFVMEVGKQPVIFENPMYAAKDSTSKVGLAVQGPSVSSQVTPENVEN QNYGRSIDPSEIVPEPKPASPGADETQGTKNWIFKRKPKQTTNFENPIY AEMDTEQKEAVAVAPPPSPSLPAKASKRSSTPGYTATEDTFKDTANLVK EDSDV
SEQ ID NO: 21	A-1	QDSTSDLIPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGWYVVLGAGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVVSQNREYFKITLYGRKTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 22	A-2	QDSTSDLIPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGWYVVLGAGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVVSQNREYFKITLYGQTQELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 23	A-3	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVLGAGNAILQEDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVVSQNREYFKITLYGRKTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
		LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 24	B-1	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVLGAGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIQ SYPLGTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVVSQNREYFKITLYGRKTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG

ES 2 667 066 T3

SEQ ID NO: 25	B-3	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 26	B-4	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 27	B-5	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELKEDGSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 28	C-1	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ TMYATIYELKEDKSYNVTSVLFQKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNQNEYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSQSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 29	C-3	QDSTSDLIPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ TMYATIYELKEDKSYNVTSVLFQKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSQSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 30	C-4	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNQNEYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSQSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 31	C-5	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFQKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSQSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 32	D-1	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 33	D-2	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDGSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 34	E-2	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGQTQELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 35	F-1	QDSTSDLIPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELQEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 36	F-2	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELQEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 37	G-1	QDSTSDLIPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILQEDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 38	G-2	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILQEDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGQTQELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 39	G-3	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSQSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG

ES 2 667 066 T3

SEQ ID NO: 40	H-1	QDSTSDLIAPAPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENNIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 41	H-2	QDSTSDLIAPAPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVSQNQEYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENNIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 42	H-3	QDSTSDLIAPAPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVSQNREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENNIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 43	H-5	QDSTSDLIAPAPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENNIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 44	I-4	QDSTSDLIAPAPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 45	I-5	QDSTSDLIAPAPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNQEYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 46	L-1	QDSTSDLIAPAPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILQEDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGQTQELTSE LKENFIRFSQSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 47	L-2	QDSTSDLIAPAPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILQEDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFQKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGQTQELTSE LKENFIRFSQSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 48	B-5-1	QDSTSDLIAPAPLSKVPLAPDFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVSQNREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENNIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 49	B-5-2	QDSTSDLIAPAPLSKVPLAPDFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPQ KMYATIYELAEDGSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVSQNREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENNIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 50	B-5-5	QDSTSDLIAPAPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPQ KMYATIYELKEDGSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVSQNREYFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENNIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 51	WT-1	QDSTSDLIAPAPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGATAELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 52	WT-3	QDSTSDLIAPAPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILAEDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGATAELTSE LKENFIRFSASLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 53	WT-4	QDSTSDLIAPAPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGATAELTSE LKENFIRFSASLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 54	WT-4-1	QDSTSDLIAPAPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFAKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGATAELTSE LKENFIRFSASLGLPENHIVFPVPIDQCIDG

ES 2 667 066 T3

SEQ ID NO: 55	WT-4-1-4	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILAEDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFAKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGATAELTSE LKENFIRFSASLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 56	D1-1	QDSTSDLIPAPPLSKVPLAPDFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 57	D1-4	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 58	D1-4-1	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELAEDGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPEDAIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 59	D1-4-2	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELAEDGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 60	D1-4-2-1	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELAEDGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSESAEYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 61	D1-4-2-1-1	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO TMYATIYELAEDGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSESAEYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 62	D1-4-2-1-3	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELAEDGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSESAEYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 63	D1-4-2-1-4	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO TMYATIYELAEDGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSESAEYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 64	D1-4-2-1-1-1	QDSTSDLIPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO TMYATIYELAEDGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSESAEYFKITLYGRKELTSE LAENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 65	D1-4-2-1-1-2	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO TMYATIYELAEDGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSESAEYFKITLYGRKELTSE LAENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 66	D1-4-2-1-1-4	QDSTSDLIPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO TMYATIYELAEDGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSESAEYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 67	K3-4	QDSTSDLIPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO TMYATIYELKEDKSYNVTSVLFADDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVSNQYEFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENNIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 68	K3-5	QDSTSDLIPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDPO KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFADDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVSTNYNQFAMVFFKKVSNQYEFKITLYGRKELTSE LQENFIRFSKSLGLPENNIVFPVPIDQCIDG

SEQ ID NO: 69	Mutante de NGAL	X ₁ DSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 70	Mutante de NGAL	QX ₂ STSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 71	Mutante de NGAL	QDX ₃ TSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 72	Mutante de NGAL	QDSX ₄ SDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 73	Mutante de NGAL	QDSTX ₅ DLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 74	Mutante de NGAL	QDSTX ₆ LIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 75	Mutante de NGAL	QDSTDX ₇ IPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 76	Mutante de NGAL	QDSTSDLX ₈ PAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 77	Mutante de NGAL	QDSTSDLIX ₉ APPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 78	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPX ₁₀ PPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 79	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAX ₁₁ PLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 80	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPX ₁₂ LSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V

SEQ ID NO: 81	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPX ₁₃ SKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 82	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLX ₁₄ KVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 83	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSX ₁₅ VPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 84	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKX ₁₆ PLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 85	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVX ₁₇ LQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 86	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPX ₁₈ QQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 87	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLX ₁₉ QNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 88	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQX ₂₀ NFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₂₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 89	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQX ₂₁ QDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₂₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 90	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNX ₂₂ QDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₂₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 91	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNF ₂₃ DNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₂₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 92	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQX ₂₄ NQFQGKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₂₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V

SEQ ID NO: 93	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDX ₂₅ QFGKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₂₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 94	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNX ₂₆ FQKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₂₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 95	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQX ₂₇ QKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₂₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 96	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFX ₂₈ GKQWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₂₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 97	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFX ₂₉ KWYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₂₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 98	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFGX ₃₀ WYVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₃₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 99	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFGKX ₃₁ YVVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₃₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 100	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFGKW ₃₂ VVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₃₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 101	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFGKWYX ₃₃ VVLGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₃₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 102	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFGKWYVX ₃₄ LAGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₃₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 103	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFGKWYVX ₃₅ LAGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₃₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 104	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFGKWYVX ₃₆ AGNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSLVFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSLYLRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₃₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V

SEQ ID NO: 105	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVG ₃₇ LX ₃₇ GNAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPG ₃₇ EFTLGNI KSYPG ₃₇ LTSYLVRVVSTN ₃₇ YNQH ₃₇ AMVFFK ₃₇ VSNREYFKITLYGR ₃₇ TKE ₃₇ LS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₃₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 106	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVG ₃₈ LAX ₃₈ NAILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPG ₃₈ EFTLGNI KSYPG ₃₈ LTSYLVRVVSTN ₃₈ YNQH ₃₈ AMVFFK ₃₈ VSNREYFKITLYGR ₃₈ TKE ₃₈ LS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₃₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 107	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVG ₃₉ LAX ₃₉ AILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPG ₃₉ EFTLGNI KSYPG ₃₉ LTSYLVRVVSTN ₃₉ YNQH ₃₉ AMVFFK ₃₉ VSNREYFKITLYGR ₃₉ TKE ₃₉ LS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₃₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 108	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVG ₄₀ LAGN ₄₀ X ₄₀ ILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPG ₄₀ EFTLGNI KSYPG ₄₀ LTSYLVRVVSTN ₄₀ YNQH ₄₀ AMVFFK ₄₀ VSNREYFKITLYGR ₄₀ TKE ₄₀ LS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₄₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 109	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVG ₄₁ LAGNAX ₄₁ LREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPG ₄₁ EFTLGNI KSYPG ₄₁ LTSYLVRVVSTN ₄₁ YNQH ₄₁ AMVFFK ₄₁ VSNREYFKITLYGR ₄₁ TKE ₄₁ LS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₄₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 110	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVG ₄₂ LAGNAX ₄₂ ILREDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPG ₄₂ EFTLGNI KSYPG ₄₂ LTSYLVRVVSTN ₄₂ YNQH ₄₂ AMVFFK ₄₂ VSNREYFKITLYGR ₄₂ TKE ₄₂ LS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₄₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 111	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVG ₄₃ LAGNAILX ₄₃ EDKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPG ₄₃ EFTLGNI KSYPG ₄₃ LTSYLVRVVSTN ₄₃ YNQH ₄₃ AMVFFK ₄₃ VSNREYFKITLYGR ₄₃ TKE ₄₃ LS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₄₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, R
SEQ ID NO: 112	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVG ₄₄ LAGNAILRX ₄₄ DKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPG ₄₄ EFTLGNI KSYPG ₄₄ LTSYLVRVVSTN ₄₄ YNQH ₄₄ AMVFFK ₄₄ VSNREYFKITLYGR ₄₄ TKE ₄₄ LS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₄₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 113	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVG ₄₅ LAGNAILREX ₄₅ DKDP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPG ₄₅ EFTLGNI KSYPG ₄₅ LTSYLVRVVSTN ₄₅ YNQH ₄₅ AMVFFK ₄₅ VSNREYFKITLYGR ₄₅ TKE ₄₅ LS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₄₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 114	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVG ₄₆ LAGNAILREDX ₄₆ DP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPG ₄₆ EFTLGNI KSYPG ₄₆ LTSYLVRVVSTN ₄₆ YNQH ₄₆ AMVFFK ₄₆ VSNREYFKITLYGR ₄₆ TKE ₄₆ LS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₄₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 115	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVG ₄₇ LAGNAILREDKX ₄₇ DP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPG ₄₇ EFTLGNI KSYPG ₄₇ LTSYLVRVVSTN ₄₇ YNQH ₄₇ AMVFFK ₄₇ VSNREYFKITLYGR ₄₇ TKE ₄₇ LS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₄₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 116	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVG ₄₈ LAGNAILREDKDX ₄₈ DP QKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPG ₄₈ EFTLGNI KSYPG ₄₈ LTSYLVRVVSTN ₄₈ YNQH ₄₈ AMVFFK ₄₈ VSNREYFKITLYGR ₄₈ TKE ₄₈ LS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₄₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V

ES 2 667 066 T3

SEQ ID NO: 117	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPX ₄ KMYAT ₁ IYELKEDKSYNVTSLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI SYPGLT ₁ SYLVRVSTN ₁ NQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₄₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 118	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ X ₅₀ MYAT ₁ IYELKEDKSYNVTSLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLT ₁ SYLVRVSTN ₁ NQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₅₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 119	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KX ₇₁ YAT ₁ IYELKEDKSYNVTSLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLT ₁ SYLVRVSTN ₁ NQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₅₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 120	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMX ₇₇ AT ₁ IYELKEDKSYNVTSLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLT ₁ SYLVRVSTN ₁ NQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₅₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 121	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYX ₆₇ TIYELKEDKSYNVTSLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLT ₁ SYLVRVSTN ₁ NQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₅₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 122	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYAX ₆₄ TIYELKEDKSYNVTSLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLT ₁ SYLVRVSTN ₁ NQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₅₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 123	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATX ₆₇ YELKEDKSYNVTSLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLT ₁ SYLVRVSTN ₁ NQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₅₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 124	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIX ₆₆ ELKEDKSYNVTSLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLT ₁ SYLVRVSTN ₁ NQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₅₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 125	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYX ₆₇ LKEDKSYNVTSLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLT ₁ SYLVRVSTN ₁ NQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₅₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 126	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYEX ₆₈ KEDKSYNVTSLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLT ₁ SYLVRVSTN ₁ NQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₅₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 127	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELX ₇₉ EDKSYNVTSLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLT ₁ SYLVRVSTN ₁ NQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₅₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 128	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKX ₆₇ DKSYNVTSLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNI KSYPGLT ₁ SYLVRVSTN ₁ NQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₆₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V

SEQ ID NO: 129	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEX ₆₁ KSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₆₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 130	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDX ₆₂ KSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₆₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 131	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKX ₆₃ YNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₆₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 132	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSX ₆₄ NVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₆₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 133	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSX ₆₅ VTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₆₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 134	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNX ₆₆ TSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₆₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 135	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVX ₆₇ SVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₆₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 136	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVX ₆₈ VLFRRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₆₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 137	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVSX ₆₉ LFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₆₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 138	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVSX ₇₀ FRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₇₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 139	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVSX ₇₁ RKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₇₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 140	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVSX ₇₂ KKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₇₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, R

ES 2 667 066 T3

SEQ ID NO: 141	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRX ₇₃ KKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₇₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 142	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKX ₇₄ KCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₇₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 143	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKX ₇₅ CDYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₇₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 144	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKX ₇₆ DYWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₇₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 145	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCX ₇₇ YWIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₇₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 146	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDX ₇₈ WIRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₇₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 147	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYX ₇₉ IRTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₇₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 148	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWX ₈₀ RTFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₈₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 149	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWX ₈₁ TFVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₈₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, R
SEQ ID NO: 150	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRX ₈₂ FVPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₈₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 151	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTX ₈₃ VPGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₈₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 152	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFX ₈₄ PGCQPGFTLGNI KSYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₈₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V

SEQ ID NO: 153	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVX ₈₅ GCQPGFETLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₈₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 154	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVX ₈₆ GCQPGFETLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₈₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 155	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGX ₈₇ QPGFETLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₈₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 156	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGX ₈₈ QPGFETLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₈₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 157	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCX ₈₉ QPGFETLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₈₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 158	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQX ₉₀ QPGFETLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₉₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 159	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGX ₉₁ FTLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₉₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 160	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEX ₉₂ TLGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₉₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 161	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFX ₉₃ LGNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₉₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 162	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTX ₉₄ GNI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₉₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 163	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLX ₉₅ NI KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₉₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 164	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGX ₉₆ I KSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELKTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₉₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V

ES 2 667 066 T3

SEQ ID NO: 165	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNI ₉₇ KSYPGLT ₉₇ SYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₉₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 166	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNI ₉₈ KSYPGLT ₉₈ SYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₉₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 167	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNI ₉₉ KSYPGLT ₉₉ SYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₉₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 168	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNI ₁₀₀ KSYPGLT ₁₀₀ SYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₀₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 169	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNI ₁₀₁ KSYPGLT ₁₀₁ SYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₀₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 170	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNI ₁₀₂ KSYPGLT ₁₀₂ SYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₀₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 171	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNI ₁₀₃ KSYPGLT ₁₀₃ SYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₀₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 172	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNI ₁₀₄ KSYPGLT ₁₀₄ SYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₀₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 173	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNI ₁₀₅ KSYPGLT ₁₀₅ SYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₀₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 174	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNI ₁₀₆ KSYPGLT ₁₀₆ SYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₀₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 175	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNI ₁₀₇ KSYPGLT ₁₀₇ SYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₀₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 176	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNI ₁₀₈ KSYPGLT ₁₀₈ SYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELTS SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₀₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V

SEQ ID NO: 177	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPLGTSYLVX ₁₀₉ VVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₀₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, R
SEQ ID NO: 178	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPLGTSYLVX ₁₁₀ VVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₁₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 179	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPLGTSYLVX ₁₁₁ VVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₁₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 180	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPLGTSYLVX ₁₁₂ VVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₁₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 181	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPLGTSYLVX ₁₁₃ VVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₁₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 182	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPLGTSYLVX ₁₁₄ VVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₁₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 183	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPLGTSYLVX ₁₁₅ VVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₁₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 184	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPLGTSYLVX ₁₁₆ VVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₁₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 185	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPLGTSYLVX ₁₁₇ VVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₁₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 186	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPLGTSYLVX ₁₁₈ VVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₁₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, H
SEQ ID NO: 187	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPLGTSYLVX ₁₁₉ VVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₁₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 188	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPLGTSYLVX ₁₂₀ VVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₂₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V

SEQ ID NO: 189	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMX ₁₂₁ FFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₂₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 190	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVX ₁₂₂ FFKKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₂₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 191	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFX ₁₂₃ KKVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₂₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 192	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFX ₁₂₄ KVSNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₂₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 193	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKX ₁₂₅ VSQNRREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₂₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 194	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKX ₁₂₆ SNREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₂₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 195	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVX ₁₂₇ QNRREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₂₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 196	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSX ₁₂₈ NREYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₂₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 197	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQX ₁₂₉ REYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₂₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 198	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNX ₁₃₀ EYFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₃₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, R
SEQ ID NO: 199	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNRX ₁₃₁ YFKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₃₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 200	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNRX ₁₃₂ FKITLYGRTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₃₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V

ES 2 667 066 T3

SEQ ID NO: 201	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFX ₁₃₃ KITLYGRKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₃₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 202	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFX ₁₃₄ ITLYGRKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₃₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 203	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFX ₁₃₄ ITLYGRKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₃₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 204	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKIX ₁₃₅ LYGRKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₃₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 205	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITX ₁₃₇ YGRKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₃₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 206	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLX ₁₃₈ GRKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₃₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 207	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYX ₁₃₉ RTKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₃₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 208	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGX ₁₄₀ TKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₄₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, R
SEQ ID NO: 209	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRX ₁₄₁ TKELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₄₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 210	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTX ₁₄₂ ELT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₄₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 211	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKX ₁₄₃ LT SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₄₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 212	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKEX ₁₄₄ T SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₄₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V

SEQ ID NO: 213	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKWWVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELX ₁₄₅ SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₄₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 214	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKWWVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELX ₁₄₄ ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₄₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 215	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKWWVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELX ₁₄₇ LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₄₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 216	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKWWVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELX ₁₄₈ X ₁₄₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 217	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKWWVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELX ₁₄₉ LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₄₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 218	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKWWVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELX ₁₅₀ LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₅₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 219	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKWWVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELX ₁₅₁ LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₅₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 220	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKWWVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELX ₁₅₂ LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₅₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 221	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKWWVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELX ₁₅₃ LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₅₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 222	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKWWVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELX ₁₅₄ LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₅₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, R
SEQ ID NO: 223	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKWWVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELX ₁₅₅ LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₅₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 224	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKWWVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIK SYPGLTSYLVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTELX ₁₅₆ LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₅₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V

ES 2 667 066 T3

SEQ ID NO: 225	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKX ₁₅₇ SLGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₅₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, K
SEQ ID NO: 226	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKX ₁₅₈ LGLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₅₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 227	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKX ₁₅₉ GLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₅₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 228	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKX ₁₆₀ LPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₆₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 229	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKX ₁₆₁ GLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₆₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 230	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKX ₁₆₂ GLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₆₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 231	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKX ₁₆₃ GLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₆₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 232	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKX ₁₆₄ GLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₆₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 233	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKX ₁₆₅ GLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₆₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V, H
SEQ ID NO: 234	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKX ₁₆₆ GLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₆₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 235	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKX ₁₆₇ GLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₆₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 236	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPLGTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSE LKENFIRFSKX ₁₆₈ GLPENHIVFPVPIDQCIDG X ₁₆₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V

SEQ ID NO: 237	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPX ₁₆₉ VPIDQCIDG X ₁₆₉ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 238	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPX ₁₇₀ PIDQCIDG X ₁₇₀ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 239	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPX ₁₇₁ IDQCIDG X ₁₇₁ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 240	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPX ₁₇₂ DQCIDG X ₁₇₂ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 241	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPX ₁₇₃ QCIDG X ₁₇₃ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 242	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPX ₁₇₄ CIDG X ₁₇₄ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 243	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPX ₁₇₅ IDG X ₁₇₅ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 244	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPX ₁₇₆ DG X ₁₇₆ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 245	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPX ₁₇₇ G X ₁₇₇ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 246	Mutante de NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDKDPQ KMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPX ₁₇₈ CIDG X ₁₇₈ = Q, A, N, D, C, E, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
SEQ ID NO: 247	D1-4-2-1-4-2	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDQ TMYATIYELAEDEGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSESAEYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPX ₁₇₉ CIDG
SEQ ID NO: 248	D1-4-2-1-4-3	QDSTSDLIPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVLGNAILREDEDQ TMYATIYELAEDEGSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGEFTLGNIK SYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSESAEYFKITLYGRKELTSE LKENFIRFSKSLGLPENHIVFPX ₁₈₀ CIDG

SEQ ID NO: 249	K3-4-2	QDSTSDLI PAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVGLAGNAILREDED PQ TMYATIYELKEDGSYNVTSVLFADDGCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVVSTNYNQFAMVFFKKVSNQEQYFKITLYGRTELTSE LQENFIRFSKSLGLPENNIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 250	K3-3Con	QDSTSDLI PAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVGLAGNAILAEDED PQ KMYATIYELKEDKSYNVTSLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVVSTNYNQFAMVFFKKVSNQEQYFKITLYGATAELTSE LQENFIRFSASLGLPENNIVFPVPIDQCIDG
SEQ ID NO: 251	K3-4Con	QDSTSDLI PAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVGLAGNAILAEDED PQ KMYATIYELKEDKSYNVTSLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIQ SYPGLTSYLVRVVSTNYNQFAMVFFKKVSNQEQYFKITLYGRTELTSE LQENFIRFSASLGLPENNIVFPVPIDQCIDG

REIVINDICACIONES

1. Proteína NGAL mutante que comprende SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, en la que la proteína NGAL mutante
5 (a) puede unirse a un sideróforo, y
(b) se excreta en la orina.
- 10 2. Proteína NGAL mutante según la reivindicación 1, en la que la proteína NGAL mutante tiene actividad bacteriostática.
3. Proteína NGAL mutante según la reivindicación 1, en la que el % de la proteína NGAL mutante que se acumula en la orina en un tiempo determinado tras la administración sistémica de la proteína NGAL mutante a un sujeto es mayor que el % de proteína NGAL WT que se acumula en la orina tras la administración sistémica de proteína NGAL WT a un sujeto a lo largo del mismo periodo de tiempo; o
15 en la que el % de la proteína NGAL mutante que se acumula en la orina en un tiempo determinado tras la administración sistémica de la proteína NGAL mutante a un sujeto es 10 veces o más mayor que el % de proteína NGAL WT que se acumula en la orina tras la administración sistémica de proteína NGAL WT a un sujeto a lo largo del mismo periodo de tiempo; o
20 en la que el % de la proteína NGAL mutante que se acumula en la orina en un tiempo determinado tras la administración sistémica de la proteína NGAL mutante a un sujeto es 100 veces o más mayor el % de proteína NGAL WT que se acumula en la orina tras la administración sistémica de proteína NGAL WT a un sujeto a lo largo del mismo periodo de tiempo.
- 25 4. Proteína NGAL mutante según la reivindicación 1, en la que el % de la proteína NGAL mutante que se acumula en la orina tres horas tras la administración sistémica de la proteína NGAL mutante a un sujeto es del 1% o más; o
30 en la que el % de la proteína NGAL mutante que se acumula en la orina tres horas tras la administración sistémica de la proteína NGAL mutante a un sujeto es del 2% o más; o
en la que el % de la proteína NGAL mutante que se acumula en la orina tres horas tras la administración sistémica de la proteína NGAL mutante a un sujeto es del 5% o más.
- 35 5. Secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína NGAL mutante que comprende SEQ ID NO: 2 según la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico comprende el marco de lectura abierto de número de registro de Genbank: NM_005564 en la que los codones que codifican para los residuos 15, 46, 73, 74, 75, 98, 118, 130, 149 y 165 están mutados para que codifiquen para la proteína NGAL mutante que comprende SEQ ID NO: 2.
- 40 6. Secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína NGAL mutante que comprende SEQ ID NO: 3 según la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico comprende el marco de lectura abierto de número de registro de Genbank: NM_005564 en la que los residuos 15, 73, 74, 75, 98, 118, 130, 149 y 165 están mutados para que codifiquen para la proteína NGAL mutante que comprende SEQ ID NO: 3.
- 45 7. Secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína NGAL mutante que comprende SEQ ID NO: 4 según la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico comprende el marco de lectura abierto de número de registro de Genbank: NM_005564 en la que los residuos 62, 73, 74, 75 y 98 están mutados para que codifiquen para la proteína NGAL mutante que comprende SEQ ID NO: 4.
- 50 8. Secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína NGAL mutante que comprende SEQ ID NO: 5 según la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico comprende el marco de lectura abierto de número de registro de Genbank: NM_005564 en la que los residuos 15, 73, 74, 75 y 130 están mutados para que codifiquen para la proteína NGAL mutante que comprende SEQ ID NO: 5.
- 55 9. Vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico según las reivindicaciones 5, 6, 7 u 8 operativamente unida a un promotor.
- 60 10. Célula bacteriana que expresa de manera estable un ácido nucleico según las reivindicaciones 5, 6, 7 u 8.
11. Célula de mamífero que expresa de manera estable un ácido nucleico según las reivindicaciones 5, 6, 7 u 8.
12. Composición farmacéutica que comprende una proteína NGAL mutante según la reivindicación 1.
- 65 13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, en la que la proteína NGAL mutante está en complejo con

un sideróforo.

14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, en la que el sideróforo se selecciona del grupo que consiste en enteroquelina, pirogallol, carboximicobactina, catecol y variantes de los mismos; y/o

5

en la que el sideróforo es insensible al pH; y/o

en la que el sideróforo se une a la proteína NGAL mutante y hierro a pH urinario; y/o

10

en la que el sideróforo se une a la proteína NGAL mutante y hierro en la orina; y/o

en la que el sideróforo se une a la proteína NGAL mutante y hierro a pH sanguíneo; y/o

15

en la que el sideróforo se une a la proteína NGAL mutante y hierro en la sangre.

15. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, en la que la proteína NGAL mutante y el sideróforo están presentes en una razón molar 1:1.

20

16. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento de sobrecarga de hierro.

17. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento de una infección de las vías urinarias.

FIG. 1

[illegible]

FIG. 2

Megalina Hs	KSYDVNIQTGSNACNQPTHPNGDCSHFCFFVFNQFQVCGCPYGMRLASNHLTCEGDPNE	1020
Megalina Mm	KAYDADLQGTNYCSQTHPNGDCSHFCFFVFNQFQVCGCPYGMKLQDQMTCEGDPARE	1019
	*:***::***:* *:*,*****:*****:*****:*	
Megalina Hs	FPTEQCGLFSFPCNGRCVFNYYLCDGVDDCHDNSDEQLCGTLNNTCSSSAFTCGHG-EC	1079
Megalina Mm	PPTQQCGSSSPFCNNGKCVPSIFRCGDVDDCHDNSDEHQCGLNNTCSSSAFTCVHGGQC	1079
	: ***:***:***: : *****: **:* ***** ** *	
Megalina Hs	IPAHWRCDKRNDVDGSDHNCPTTHAPAS-CLDTQYTCDNHQCISKNVCDTNDNCGDGS	1138
Megalina Mm	IPGQWRCDKQNDCLDGSDEQNCPTRSPSTCPTSTFTCDNHMCIPKEWVCDTNDNCGDGS	1139
	,:*****:***:*****:*****:*** * *:***** ***:*****:***	
Megalina Hs	DEKNCNSTETCQPSQFNCNPHRCIDLSEVCDGDKDCVDGSDVGCVLNCTASQFKCASGD	1198
Megalina Mm	DEKNCQASGTCHPTQFRCPDHRCISPLYVCDGDKDCVDGSDVGCVLNCTSSQFKCADGS	1199
	*****::**:*:***:***:***: :*****:*****:*****:*****:*	
Megalina Hs	KCIGVTNRCDGVFDCSDNSDEAGCPTRPFGMCHSDEFQCQEDGICIPNFWECDGHPDCLY	1258
Megalina Mm	SCINSRYRCDGVYDCKDNSDEAGCPTRPFGMCHPDEFQCQGDGTCIPNTWECDGHPDCIQ	1259
	, *****:***:*****:*****:***** ** ***** *****:	
Dominio de unión a ligando 2		
Megalina Hs	GSDEHNACVPKTCPSYFHCNDGNCIHRWLCDRDNDGDMSEKDCPTQPPRCPSWQWQ	1318
Megalina Mm	GSDEHNGCVKTCSPSHFLCDGNCIYNSWVCDGNDNCRDMSDEKDCPTQPPHCPSSWQWQ	1319
	*****:*****:*,* *****:*,* ** * ***** *****:*** **	
Megalina Hs	CLGHNICVNLSVVDGIFDCPNGTDESPLCNGNSCDFNGGCTHECVQEPFGAKCLCPLG	1378
Megalina Mm	CPGYSICVNLSALCDGVFDCPNGTDESPLCNQDSCLFHNGGCTHRCIQGPFPGATCVCPIG	1379
	* *:*****:***:*****:***** :*,* *****:*,* *****:***:*	
Megalina Hs	FLLANDSKTCEDIDECILGSCSQHCYNMRGSRFCSCDTGYMLESDDRCKVTASESLLL	1438
Megalina Mm	YQLANDTKTCEDVNECDIPGFCSQHCYNMRGSRFCACDFEYTLSDGRCKVTASENLLL	1439
	: *****:*****:***** * ***** *****:*,* * ***** *****:***	
Megalina Hs	LVASQNKIIADSVTSQVHNIYSLVENGSIYVAVDFDSISGRIFWSDATQGKTWSAFQNGT	1498
Megalina Mm	VVASRDKIIMDNITAHTHNIYSLVQDVSEFVVALDFDSVTGRVFWSDLEGGKTWSAFQNGT	1499
	: *:***:*****: :*:***:***:***:***** :*****	
Megalina Hs	DRRVVFDSSIIILTETIAIDVWGRNLYWTDYALETIEVSKIDGSHRTVLISKNLNPRGLA	1558
Megalina Mm	DRRVVHDSGLSLTEMIADVWIGRNIYWTDTLETIEVSKIDGSHRTVLISKNVTKPRGLA	1559
	*,***,*,* : ** *:***:***:*****:*****:*****:***:***	
Megalina Hs	LDPRMNEHLFWSDWGHHPRIERASMDGSMRTVIVQDKIFWPCGLTIDYPNRLLYFMDSY	1618
Megalina Mm	LDPRMGDNVWFWSWDWGHHPRIERASMDGTMRTVIVQEKIYWPCGLSIDYPNRLLYFMDSY	1619
	*****:***:*****:*****:*****:***:*****:*****:*****:***:*	
Megalina Hs	LDYMFCDYNGHRRQVIASDLIRHPYALTFLFEDSVYWTDRATRRVMRANKWHGCGNQS	1678
Megalina Mm	LDYIEFCYDQGNRRQVIASDLVLHHPHALTLFEDSVFWTDRGTHQVMQANKWHGRNQS	1679
	::***:***:*****:***:***:*****:***:***:***** *****	
Megalina Hs	VMYNIQWPLGIIVAVHPSKQPNVNPFCASFRCSHLCLLSSQGPFFYSCVCPSGWLSPLDL	1738
Megalina Mm	VMYSVPQPLGIIAHPSPQPSNPFCASATCSHLCLLSSAQEPHYSCACPSGWNLSDDSV	1739
	: : **:***:***:*** ***** : *****:***:***:*****:*** *	
Megalina Hs	NCLRDDQPFLLITVRQHIIFGISLNPEVKSNDAMVPIAGIQNGLDVEFDDAEQYIYVWENP	1798
Megalina Mm	NCVRGDQPFLLISVRENVIFGISLDPEVKSNDAMVPIAGIQHGYDVEFDDAEQYIYVWENP	1799
	:*,**:***:***:*****:*****:*****:***:*** *****:***:*****	
Megalina Hs	GEIHRVKTDGNTNRTVFASISMVGPSMNALDLWISRNLYSTNPRTQSIEVLTLLHGDYRKY	1858
Megalina Mm	GEIHRVKTDGNSRTAFAPLSLLGSSGLALDWVSRNIYTTTPASRSIEVLTLLRGDTRYKY	1859
	*****:***:***:***:***:***:*****:***:*** *****:***:*****	
Megalina Hs	TLIANDGTALGVGFPITVDPARGKLYWSDQGTDSGVPAKIASANMDGTSVKILFTGNL	1918
Megalina Mm	TLITNDGTPLGVGFPVGIADVDPARGKLYWSDHGTDSGVPAKIASANMDGTSVKILFTGNM	1919
	::*****:***:*****:*****:*****:*****:*** *****:	

FIG. 2 (cont.)

Megalina Hs	EHLECVTLIDIEEQKLYWAVTGRGVIERGNVDGTRMILVHQLSHPWGIAVHDSFLYYTDE	1978
Megalina Mm	EHLEVVTLDIQEQKLYWAVTSRGVIERGNVDGTERMILVHHLAHPWGLVVHGSFLYYTDE	1979
	**** :****:*****.*****:*****:****:****:****:****	
Megalina Hs	QYEVIERVDKATGANKIVLRDNVFNRLGLQVYHRRNAAESSNGCSNNMNACQQICLPVPG	2038
Megalina Mm	QYEVIERVDKSSGSNKVVFRDNI PYLRGLRVYHRRNAADSSNGCSNNPNACQQICLPVPG	2039
	*****:****:****:****:****:****:****:****:****:****:****:****	
Megalina Hs	GLFSCACATGFKLNPDRSCSPYNSFIVVSMLSAIRGFSLELSDHSETMVPVACQGRNAL	2098
Megalina Mm	GMFSCACASGFKLSPDGRSCSPYNSFIVVSMPLPAVRGFSLELSDHSEAMVPVACQGRNVL	2099
	*:*****:****:****:*****.*****:****:*****:*****:****	
Megalina Hs	HVDVDVSSGFIYWCDFSSSVASDNAIRRIKPDGSSLMNIVTHGIGENGVRGIAVDWVAGN	2158
Megalina Mm	HADVVDANGFIYWCDFSSSVRSSNGIRRIKPNGSNFTNIVTYGIGANGIRGVAVDWVAGN	2159
	*:*****:*****.*****:****:*****:****:****:*****:****	
Megalina Hs	LYFTNAFVSETLIEVLIRINTTYRRVLLKVTVDMPRHIVVDPKNRYLFWADYGQRPKIER	2218
Megalina Mm	LYFTNAFVYETLIEVIRINTTYRRVLLKVSVDMPRHIVVDPKHRYLFWADYGQRPKIER	2219
	***** :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Megalina Hs	FLDCTNRTVLVSEGIIVTPRGLAVDRSDGYVYVDDSLDIIARIRINGENSEVIRYGSRYP	2278
Megalina Mm	FLDCTNRTVLVSEGIIVTPRGLAVDHDGTGYIYVDDSLDIIARIHRDGGESQVRYGSRYP	2279
	*****:*****:*****:****:*****:*****:****:****:*****:****	
Megalina Hs	TPYGITVFENSIIWVDRNLKKIFQASKEPENTEPPTVIRDNINWLRDVTIFDKQVQPRSP	2338
Megalina Mm	TPYGITVFGESIIWVDRNLRKVPQASKQPGNTDPPTVIRDSINLLRDVTIFDEHVQPLSP	2339
	***** :*****:*****:****:****:****:****:*****:****:****:****	
Megalina Hs	AEVNNNPCLENNGGCSHLCFALPGLHTPKCDCAFGLTQSDGKNCAISTENFLIFALSNSL	2398
Megalina Mm	AELNNNPCLOSGGGCSHFCFALPELTPKCGCAFGLTLEDDGKNCATSREDFLIYSLNNSL	2399
	*:*****:*****:***** :*****.*****:***** :***** :*****:****	
Megalina Hs	RSLHLDPENHSPFQTINVERTVMSLDYDSVSDRIYFTQNLASGVGQISYATLSSGIHTP	2458
Megalina Mm	RSLHFDPDHNLFPQAISVEGMAIALDYDRNNRIFFTQKLNPIRGQISYVNLVSGASSP	2459
	*****:****:****.*****:****.****.****.****.****.****.****.****	
Megalina Hs	TVIASGIGTADGIAFDWITRRIYSDYLNQMINSMAEDGSNRTVIARVPKPRAIVLDPQC	2518
Megalina Mm	TILLSNIGVTDGIAFDWINRRIYSDFSNQTINSMAEDGSNRAVIARVSKPRAIVLDPQC	2519
	*:****.*****:*****:*****:****.*****:*****:*****:*****:****	
Megalina Hs	GYLYWADWDTHAKIERATLGGNFRVPIVNSSLVMPSGTLTDYEEDLLYWVDASLQRIERS	2578
Megalina Mm	GYMYWTDWGTNAKIERATLGGNFRVPIVNTSLVWPNGLTLDLETDLWYADASLQKIER	2579
	*****:****:****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Megalina Hs	TLTGVDREVIVNAAVHAFGLTLYGQYIYWTDLTYQRIYRANKYDGSQIAMTTNLSQPR	2638
Megalina Mm	TLTGSNREVVISAFHSFGLTVYQYIYWTDFYTKKIYRANKYDGSDLIAMTTLRLTPQS	2639
	***** :*****:****:****:*****:*****:*****:*****:*****:****	
Megalina Hs	GINTVVKNQKQCCNNPCEQFNGGCSHICAFGPNGAECQCPHEGNWYLANNRKHCIVDNGE	2698
Megalina Mm	GISTVVKTQQQCCSNPCDQFNGGCSHICAFGPNGAECQCPHEGSWYLANDNKYCVVDTGA	2699
	*****:****:****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Megalina Hs	RCGASSFTCSNGRCISEEWKCDNDNDCGDSDEMESVCAHTCSPTAFTCANGRCVQYSY	2758
Megalina Mm	RCNQFQFTCLNGRCISQDWKCDNDNDCGDSDELPTVCAFTCRSTAFTCANGRCVPYHY	2759
	*****.***** :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Megalina Hs	RCDYNDGCGDSDEAGCLFRDCNATTEFMCNNRRICIPREFICNGVDNCHDNNTSDEKNCP	2818
Megalina Mm	RCDFYNDGCGDSDEAGCLFRSCNSTTEFTCSNGRCIPLSYVCNGINNCHDNNTSDEKNCP	2819
	*****:*****:*****:*****:*****.***** :*****:*****:*****	
Megalina Hs	DRTCQSGYTKCHNSNICIPRVYLCDGDNDCGDSDENPTYCTTHTCSSSEFQCAS-GRCI	2877
Megalina Mm	PITCQPDFAKCQTTNICVPRAFLCDGDNDCGDSDENPIYCASHTCRSNEFQCVSPHRCI	2879
	*****:****:****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	

FIG. 2 (cont.)

Species	Gene	Accession	Length (bp)
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	2937
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	2939
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	2997
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	2999
Dominio de unión a ligando 3			
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	3057
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	305
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	3117
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	3119
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	3177
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	3179
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	3237
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	3239
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	3297
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	3299
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	3357
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	3359
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	3417
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	3419
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	3477
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	3479
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	3537
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	3539
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	3597
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	3599
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	3657
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	3659
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	3717
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	3719
Dominio de unión a ligando 4			
Megalina Hs	MEGALINA	U000000000	3777
Megalina Mm	MEGALINA	U000000000	3779

FIG. 2 (cont.)

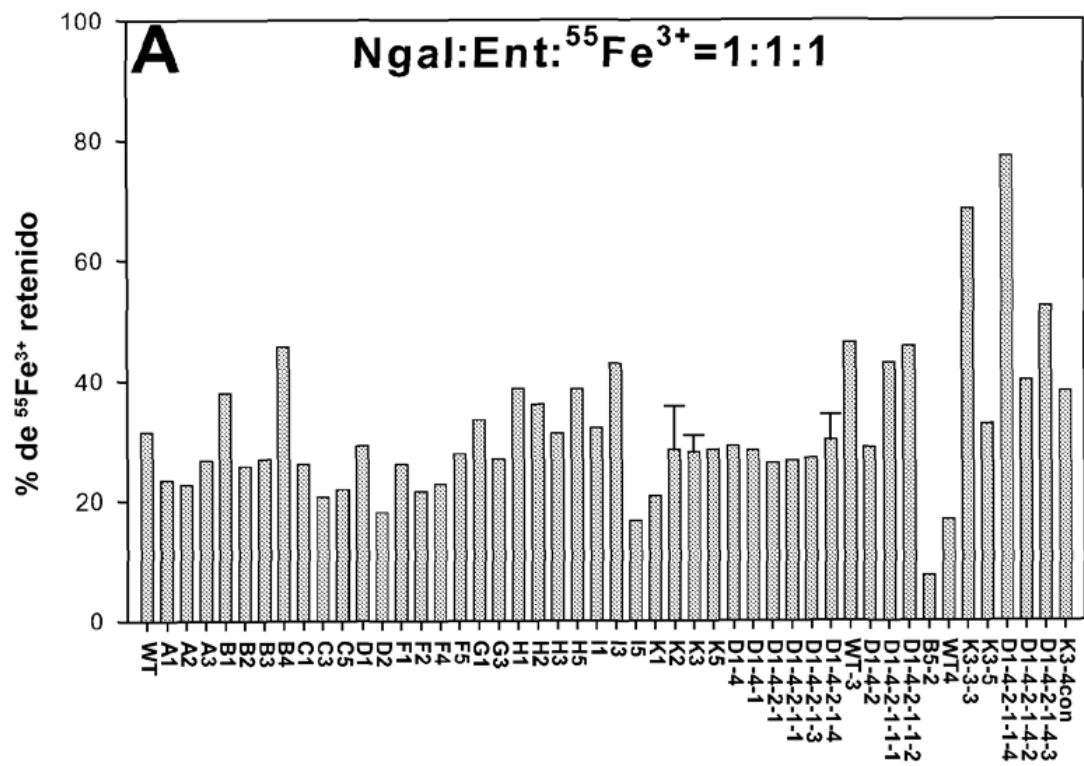


FIG. 3A

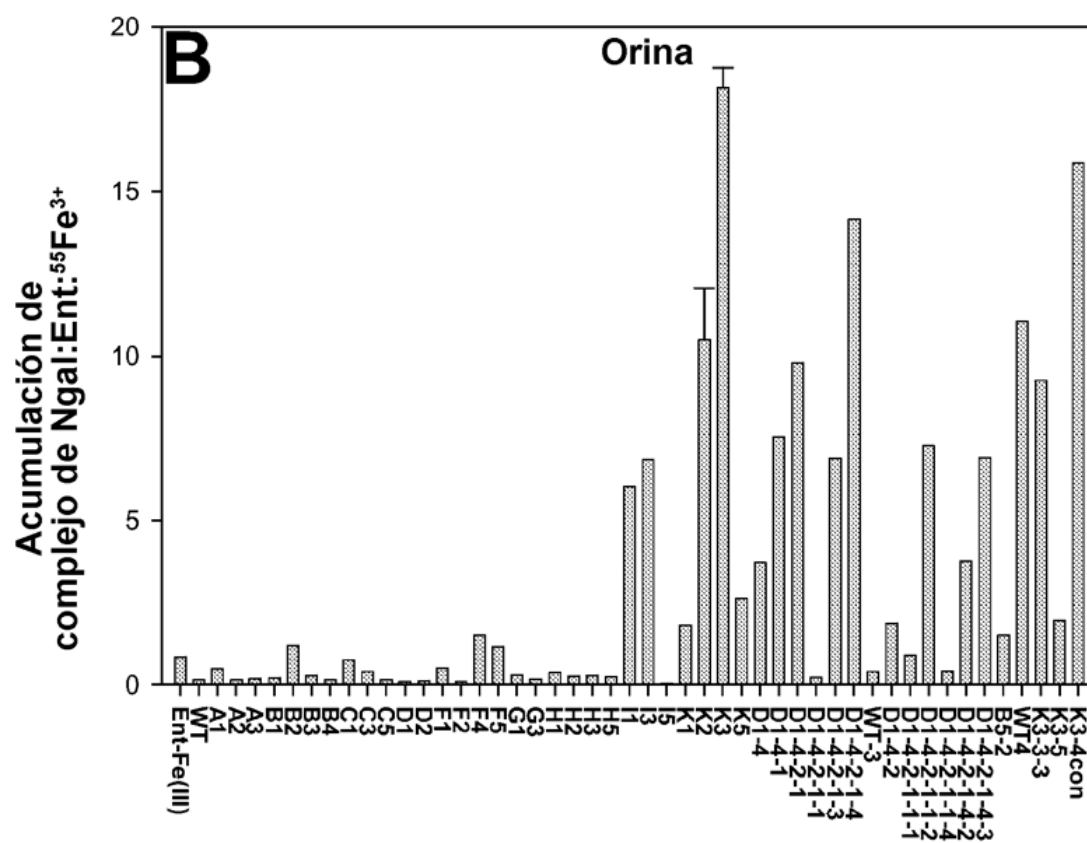
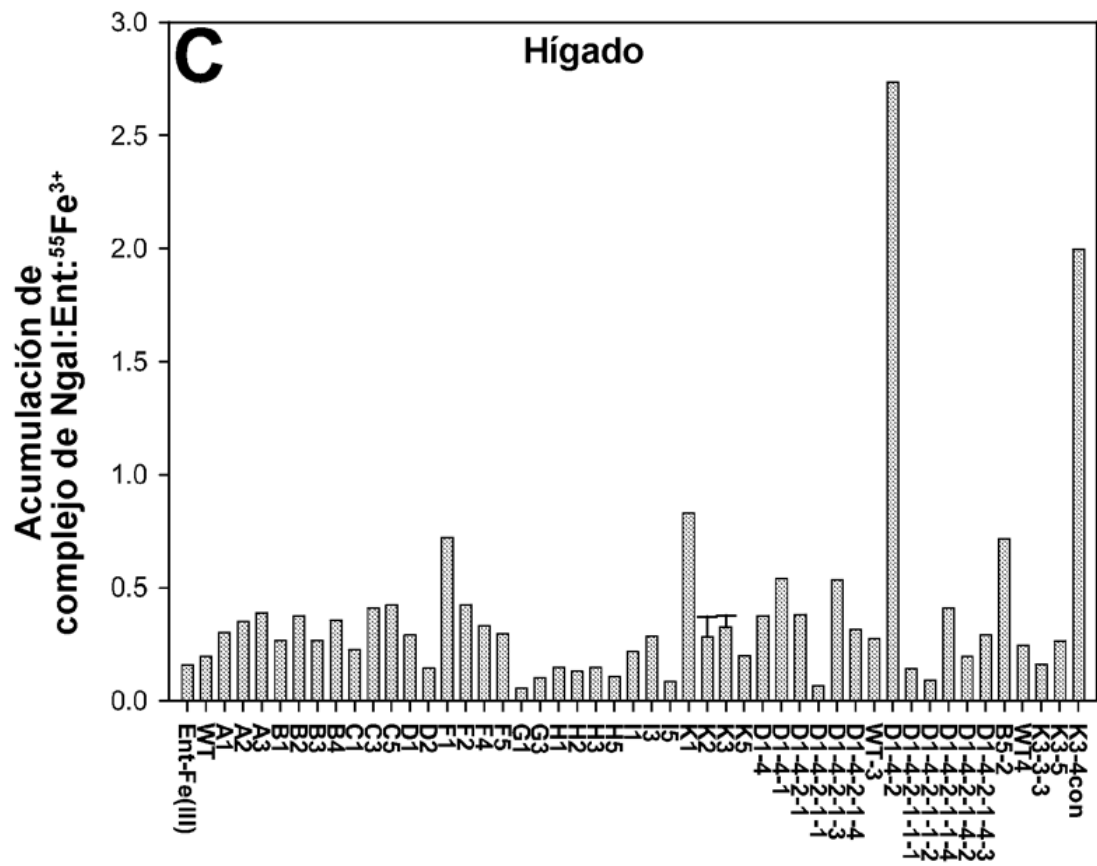


FIG. 3B



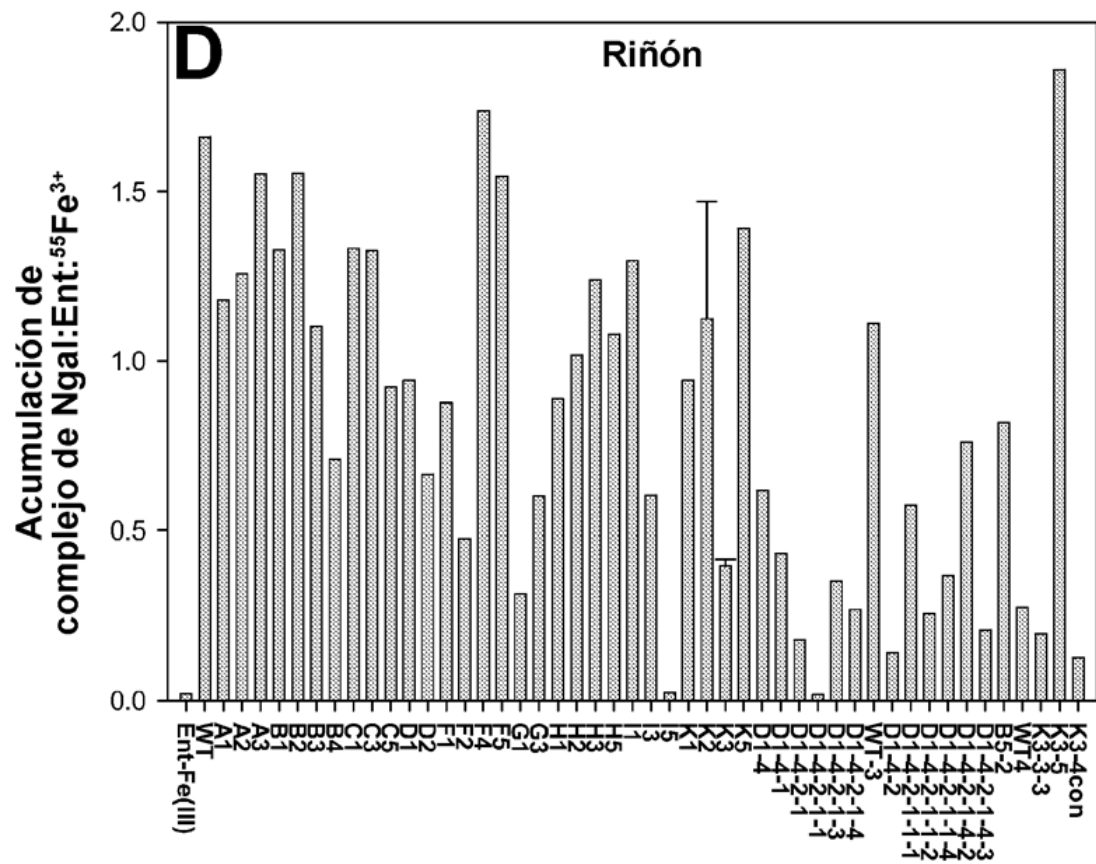


FIG. 3D

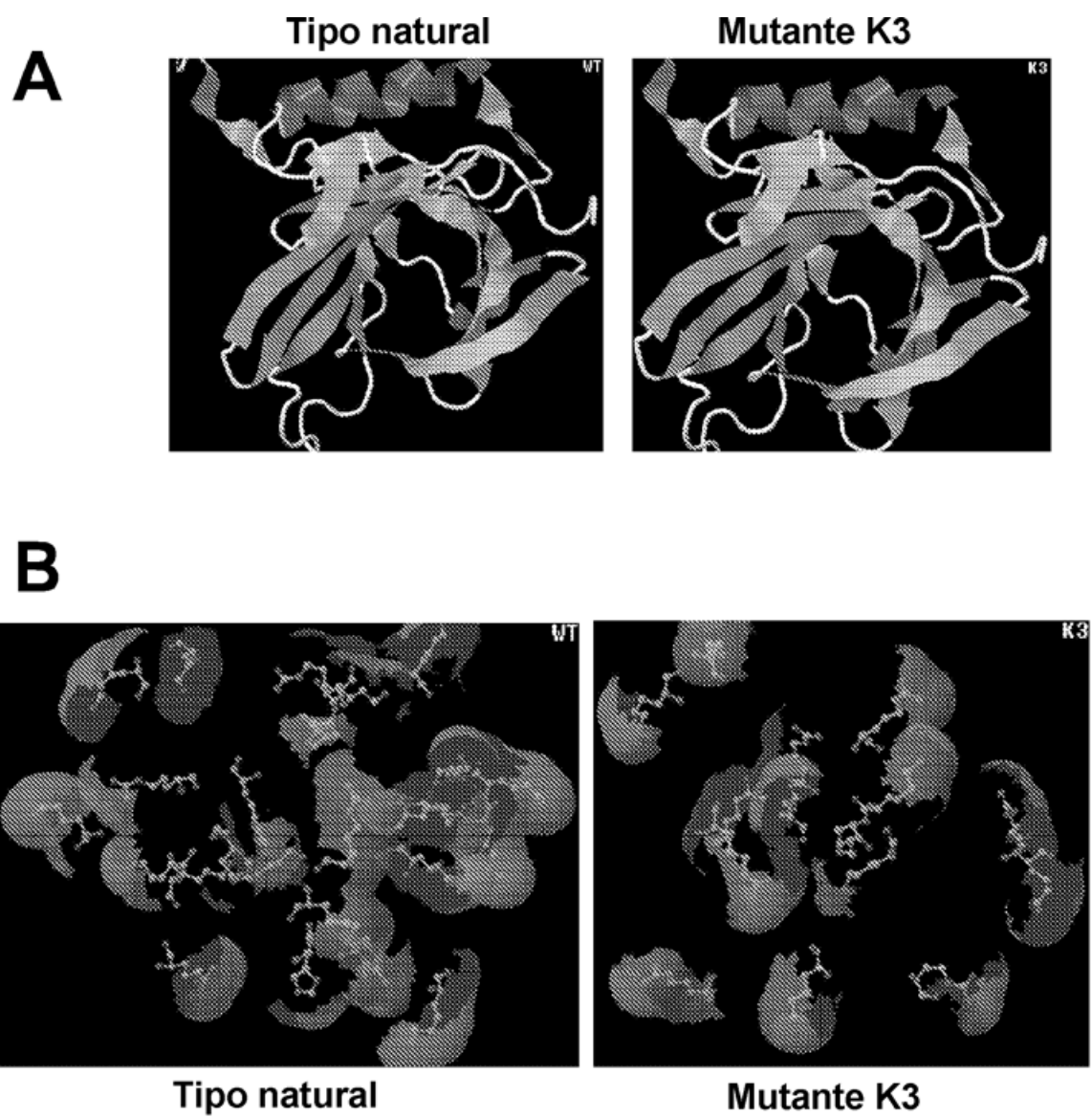


FIG. 4

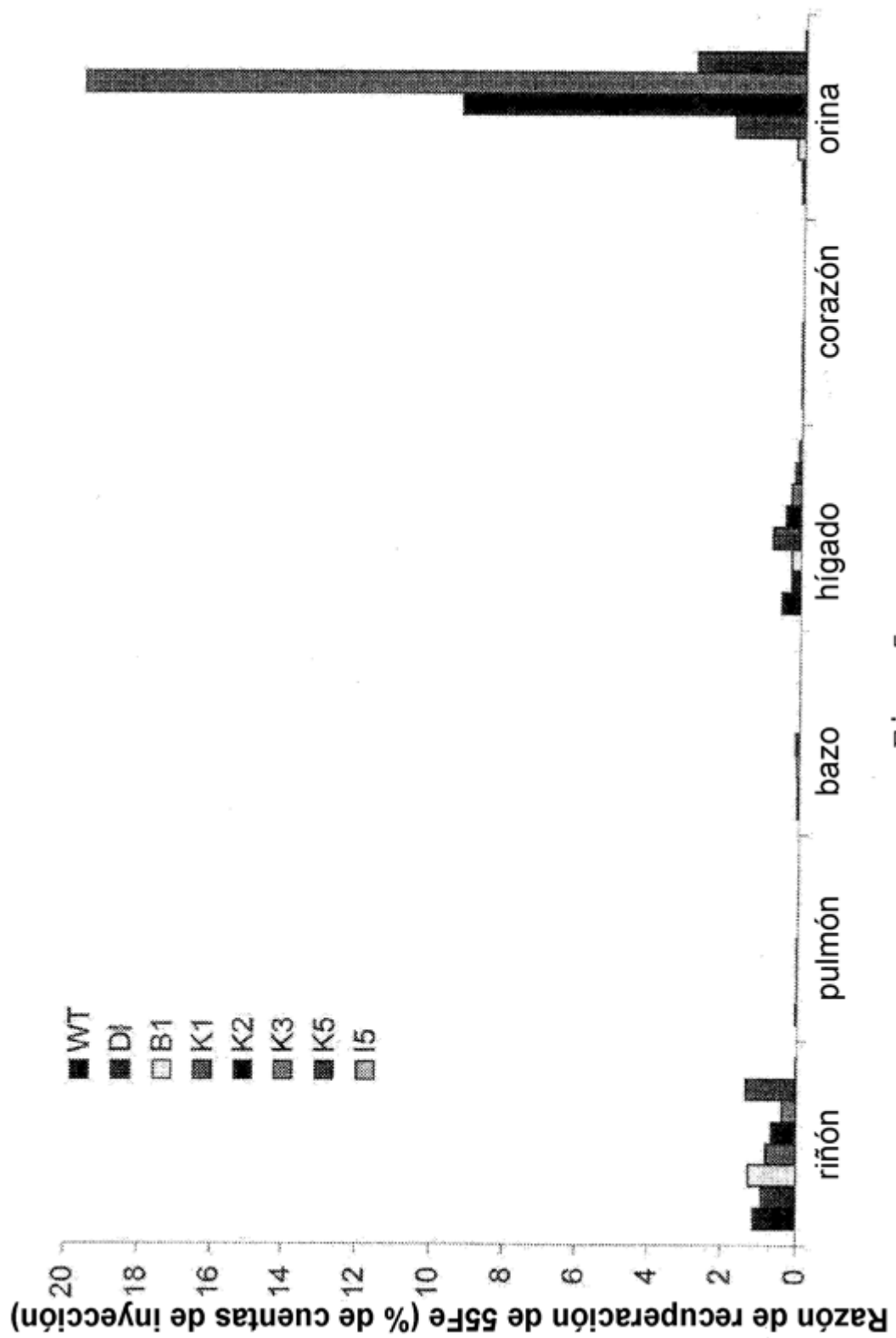


Fig. 5

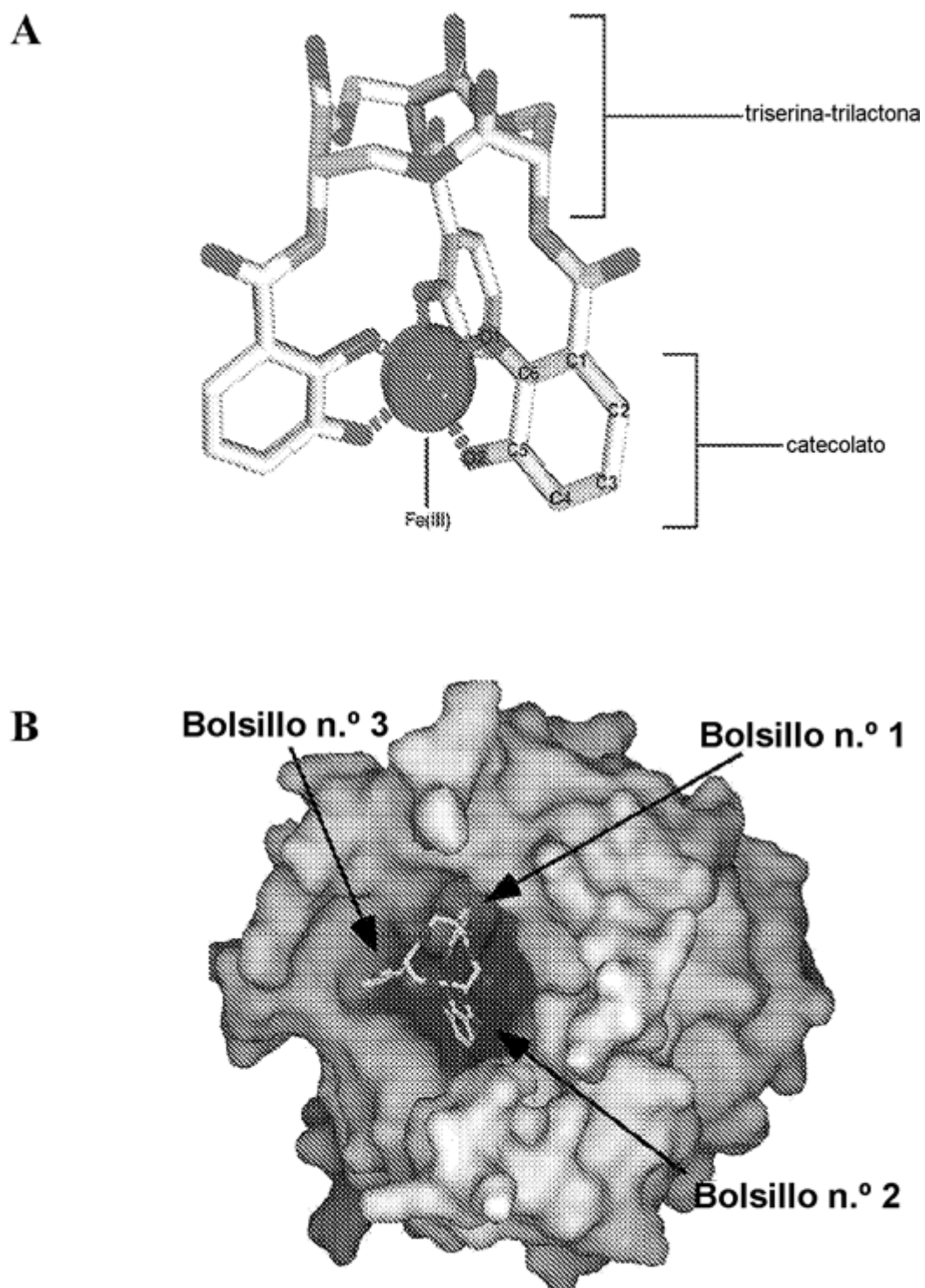


FIG. 6

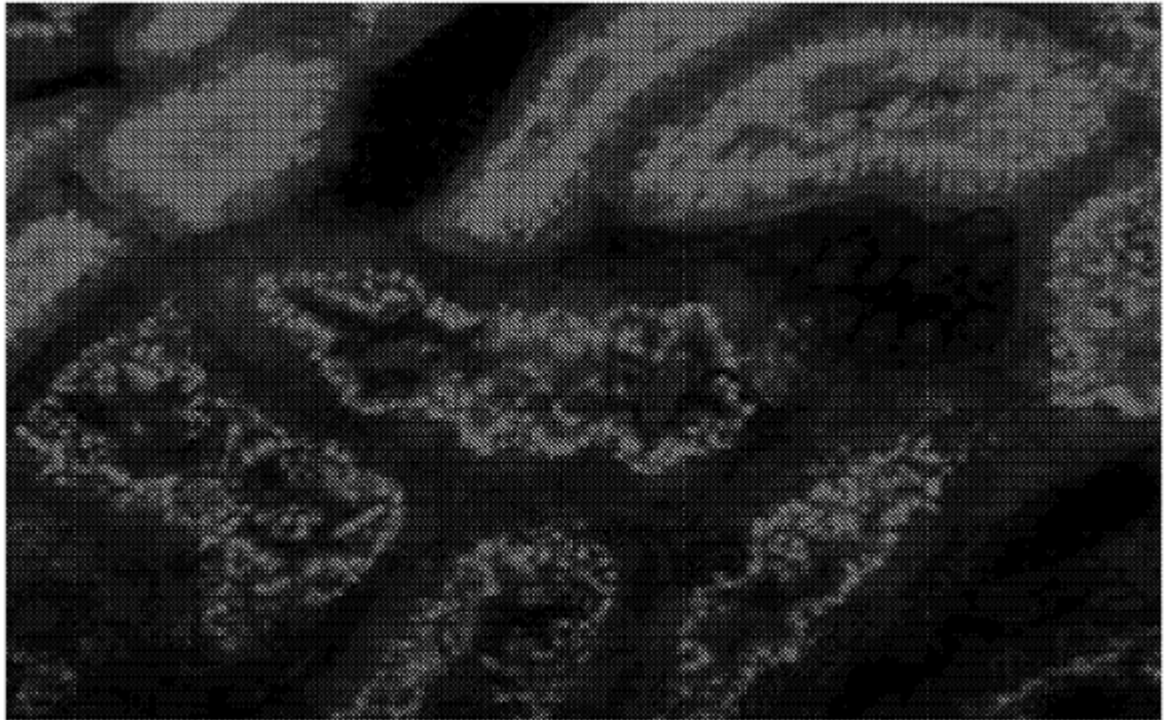


FIG. 7

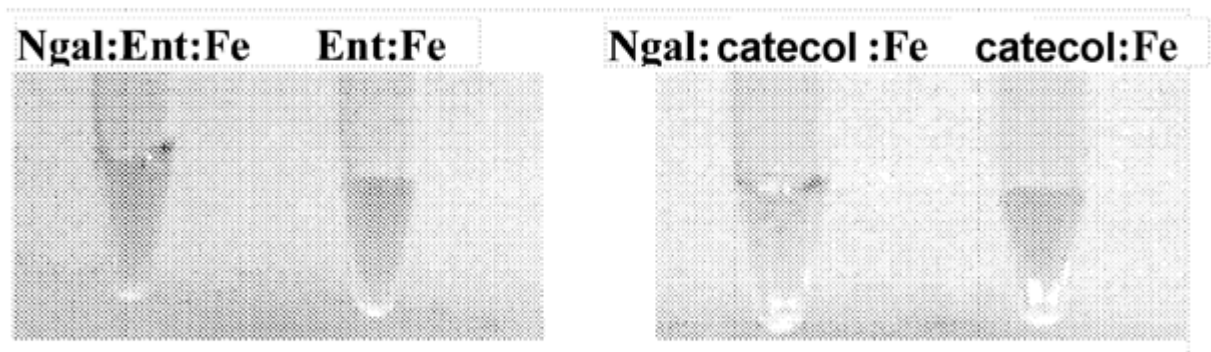


FIG. 8

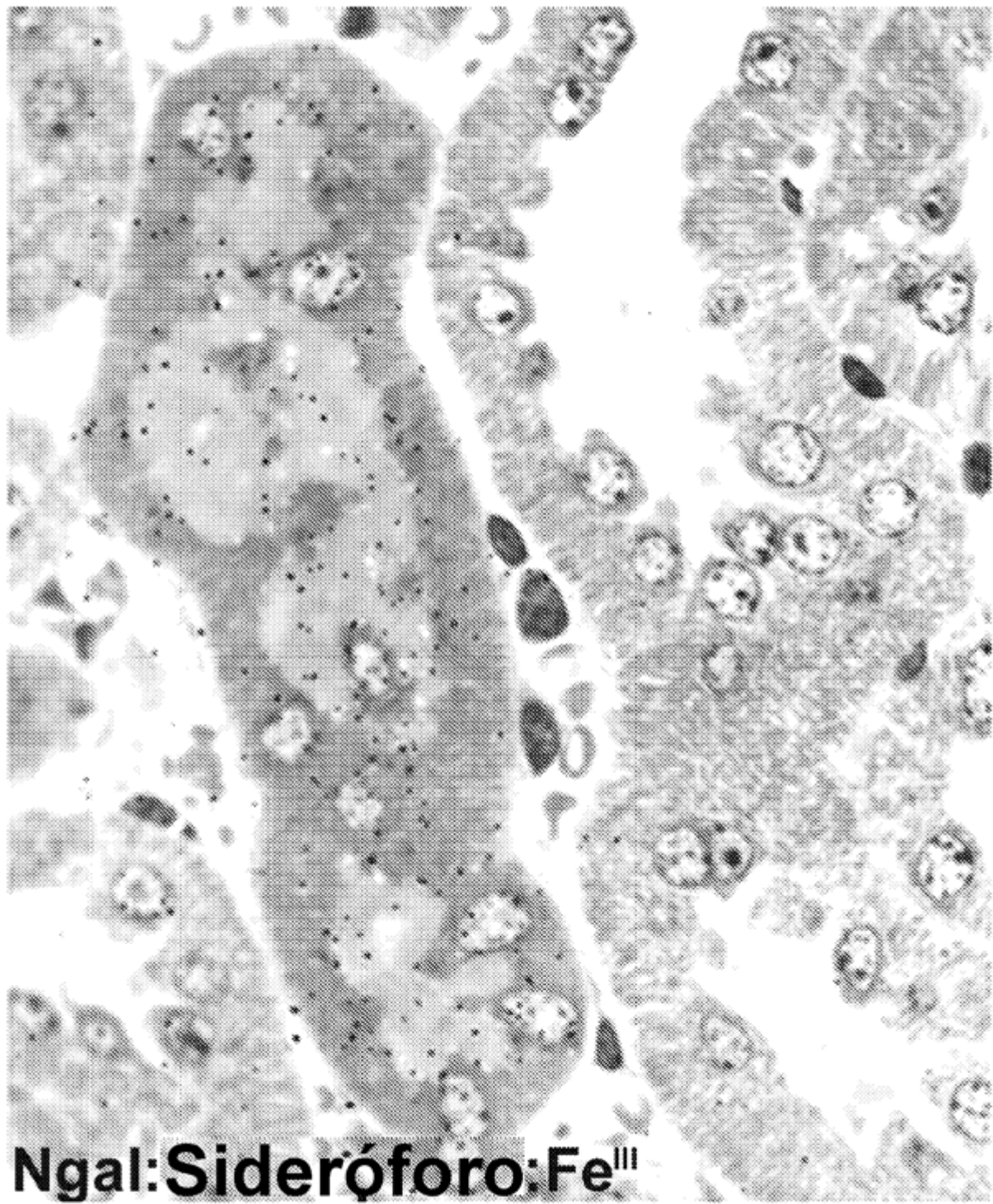


FIG. 9

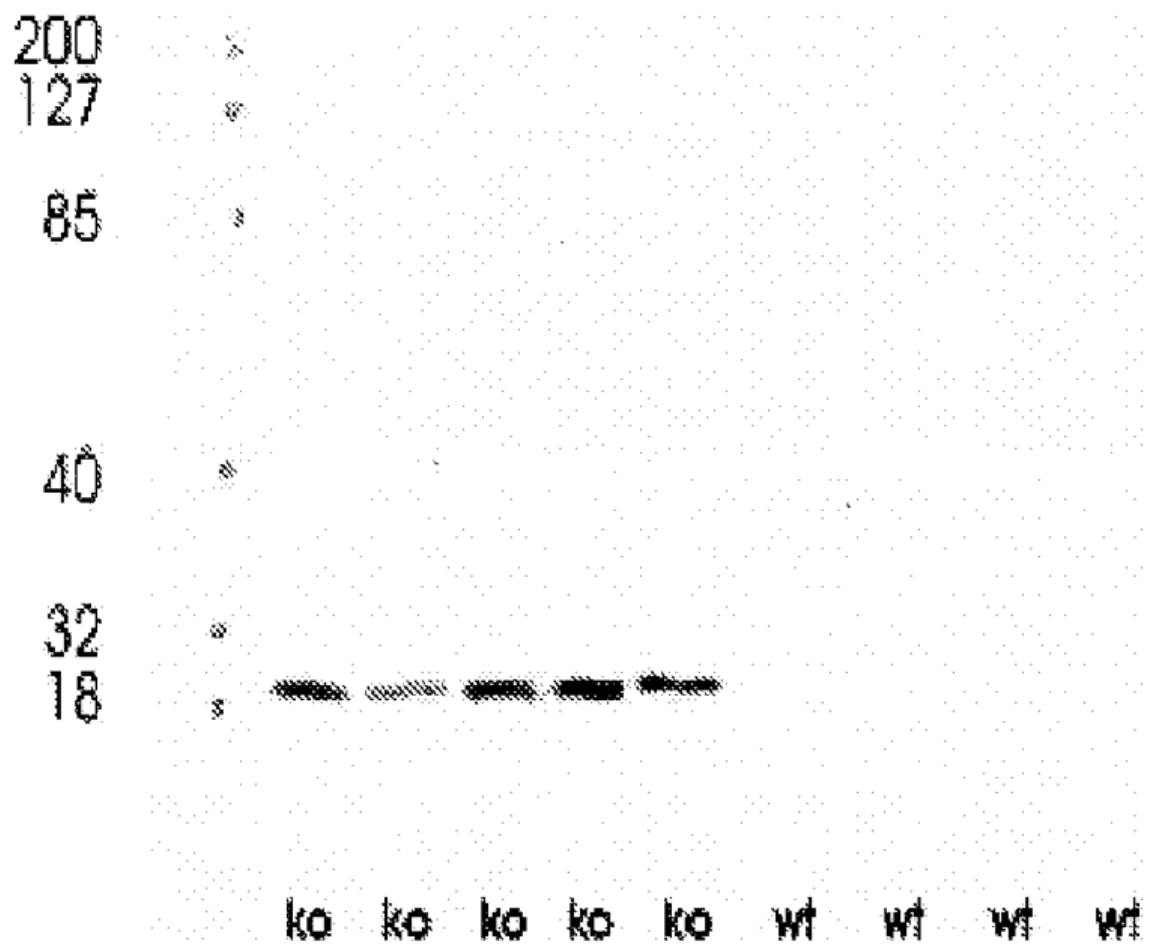


FIG. 10

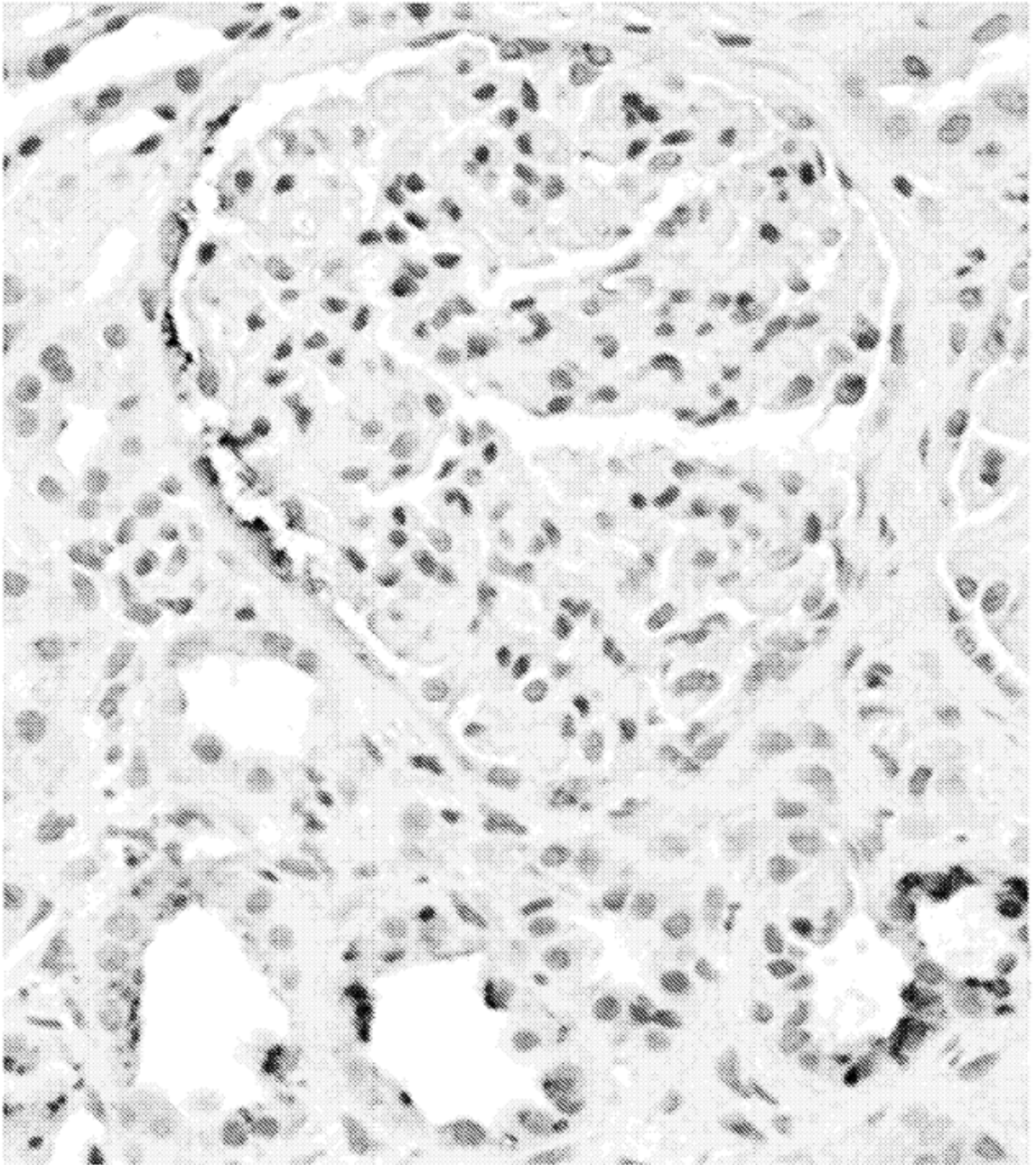


FIG. 11

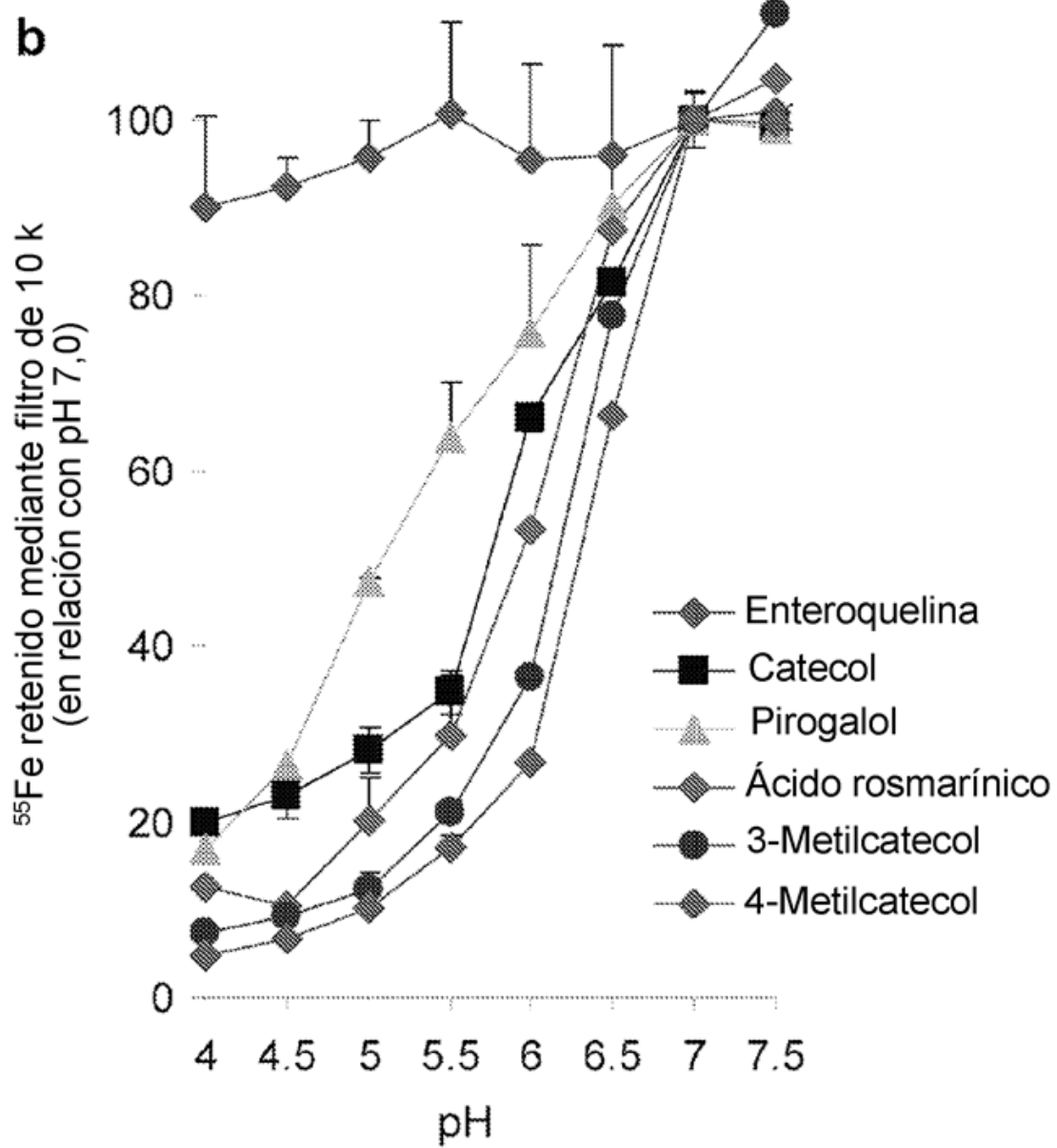


FIG. 12

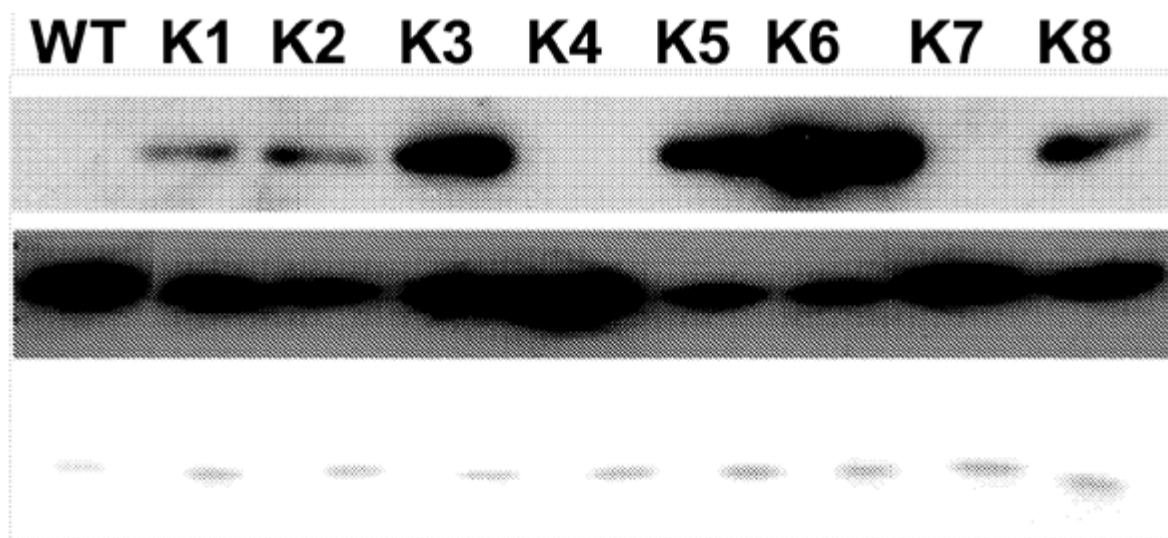


FIG. 13

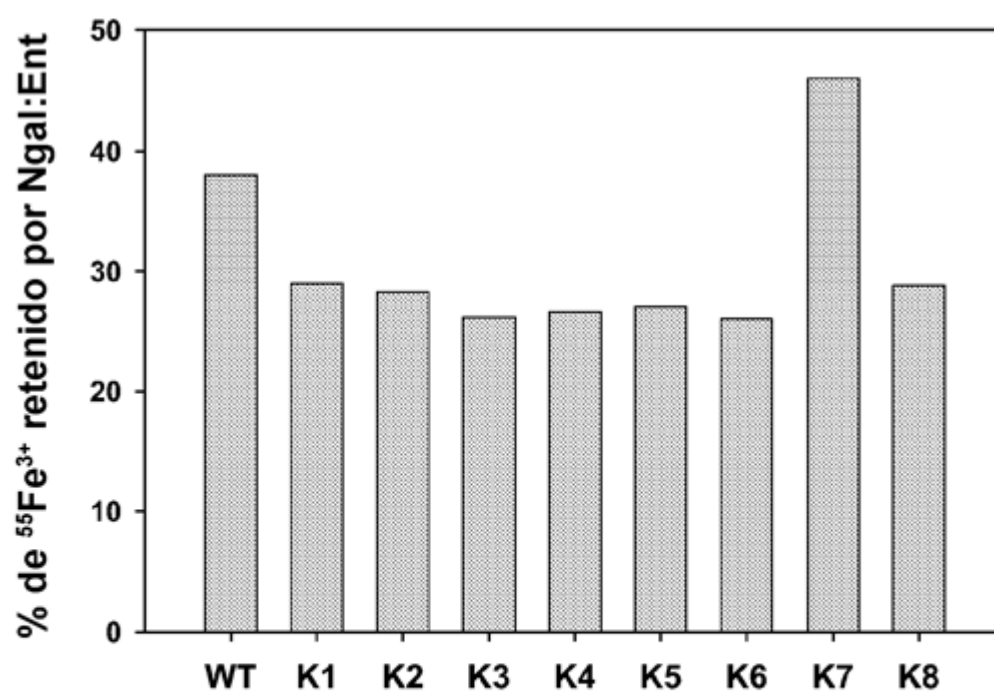


FIG. 14

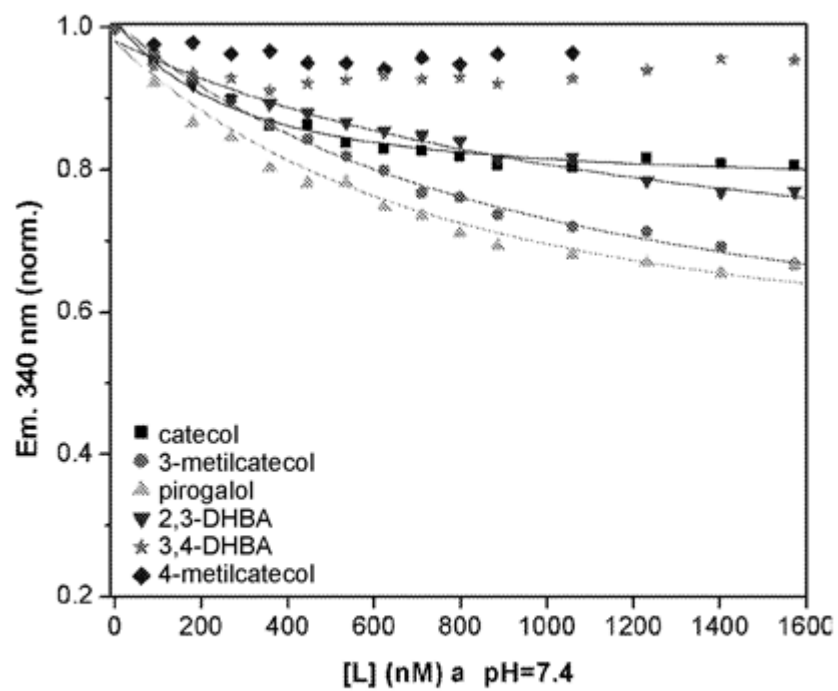


FIG. 15A

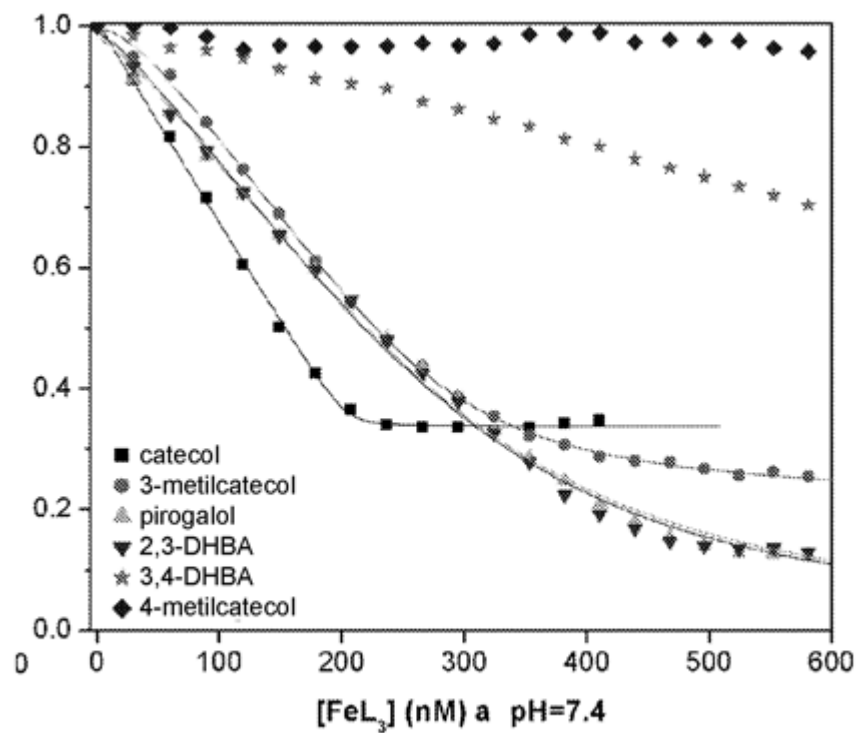


FIG. 15B

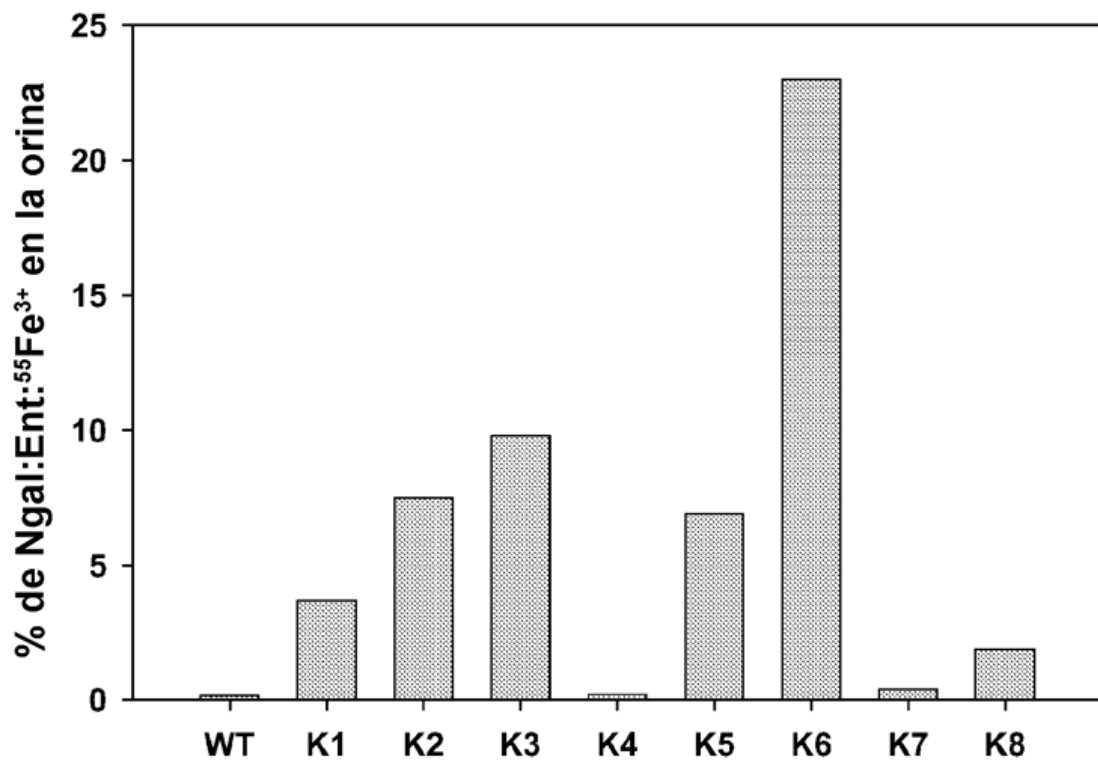


FIG. 16

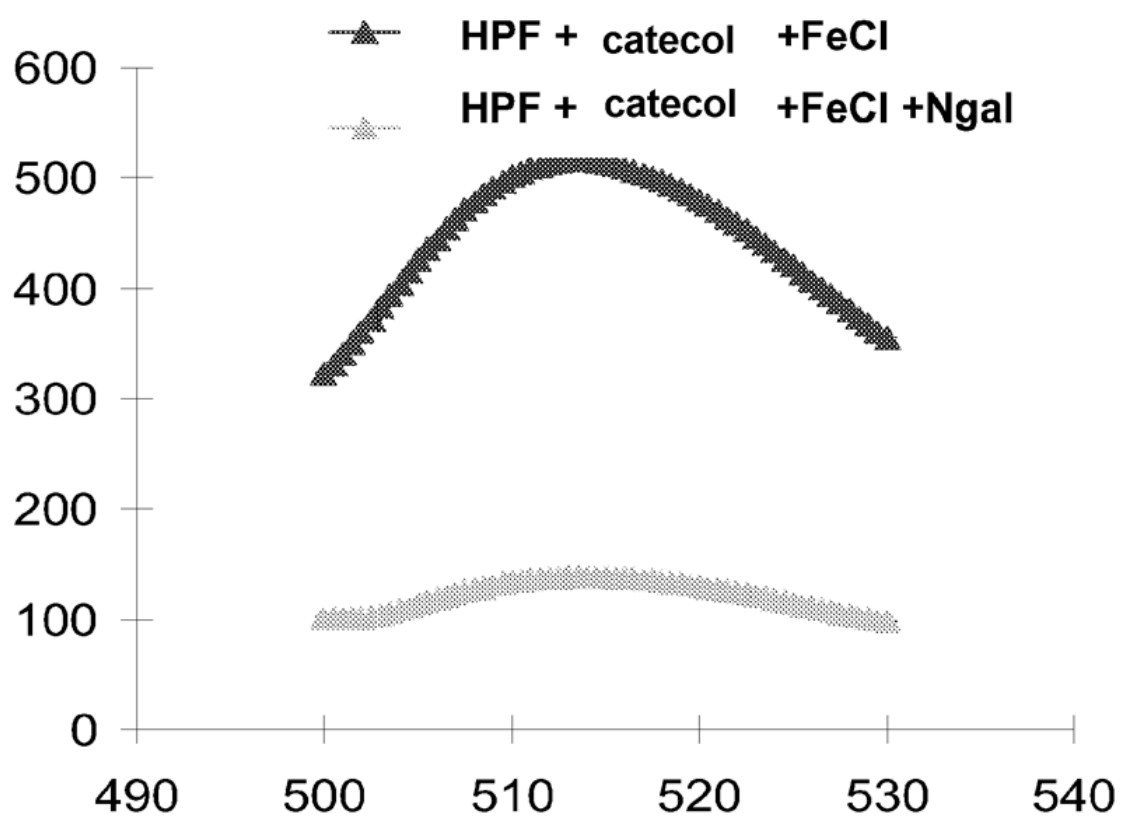


FIG. 17

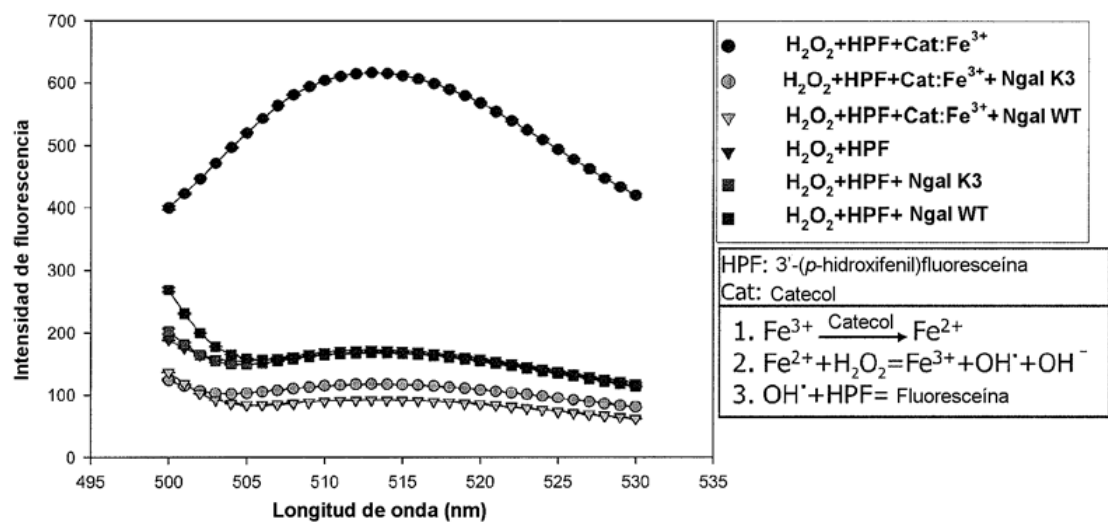


Fig. 18

> Mutante de Ngal K3 (SEQ ID NO: 2)

QDSTSDLPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVGLAGNA
ILREDEDQPKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRDDGCDYWI
RTFVPGCQPGFEFTLGNIQSYPLGTSYLVRVSTNYNQFAM
VFFKKVSNQEQYFKITLYGRTELTSELQENFIRFSKSLG
LPENNIVFPVPIDQCIDG

> Proteína Ngal de tipo natural (SEQ ID NO: 1)

QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVGLAGNA
ILREDKDPQPKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWI
RTFVPGCQPGFEFTLGNIKSYPLGTSYLVRVSTNYNQHAM
VFFKKVSNREYFKITLYGRTELTSELKENFIRFSKSLG
LPENHIVFPVPIDQCIDG

K3	QDSTSDLPAPPLSSVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVGLAGNAILREDEDQPKMYATIYELKE
60	
Tipo natural	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVGLAGNAILREDKDPQPKMYATIYELKE
60	*****.*****;*****
K3	DKSYNVTSVLFRDDGCDYWIRTFVPGCQPGFEFTLGNIQSYPLGTSYLVRVSTNYNQFAM
120	
Tipo natural	DKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFEFTLGNIKSYPLGTSYLVRVSTNYNQHAM
120	*****.*****;*****.***
K3	VFFKKVSNQEQYFKITLYGRTELTSELQENFIRFSKSLGLPENNIVFPVPIDQCIDG
178	
Tipo natural	VFFKKVSNREYFKITLYGRTELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
178	*****;*****;*****;*****

FIG. 19

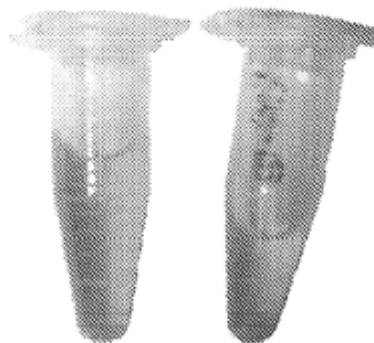


FIG. 20