

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.11.25	(73) Titular(es): GRIFOLS THERAPEUTICS INC. 4101 RESEARCH COMMONS, 79 TW ALEXANDER DRIVE RESEARCH TRIANGLE PARK, NC 27709 US
(30) Prioridade(s): 2007.11.29 US 991148 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2010.08.25	
(45) Data e BPI da concessão: 2014.12.31 074/2015	(72) Inventor(es): VALERY NOVOKHATNY US
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

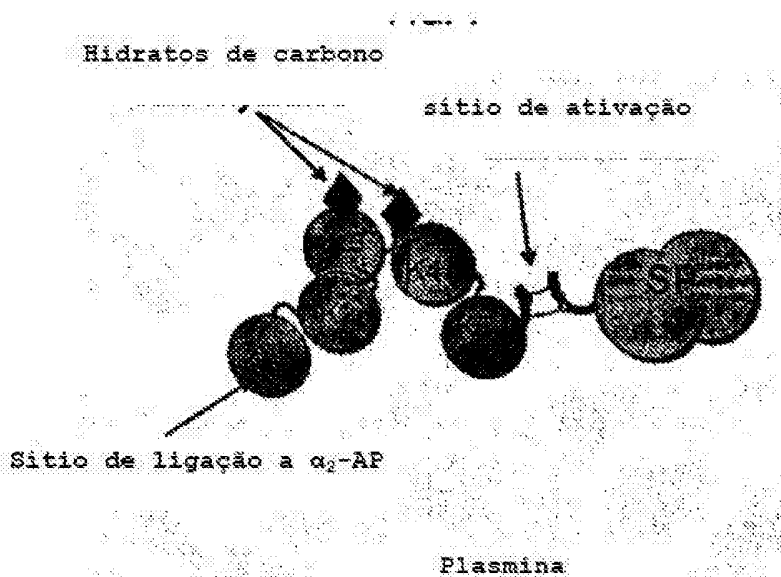
(54) Epígrafe: **PLASMINA MODIFICADA DE FORMA RECOMBINANTE**

(57) Resumo:
POLINUCLEÓTIDOS E POLIPÉPTIDOS RELACIONADOS COM UMA MOLÉCULA DE PLASMIN(OGÉNIO) MODIFICADA DE FORMA RECOMBINANTE. A MOLÉCULA DE PLASMIN(OGÉNIO) POSSUI UM DOMÍNIO KRINGLE ÚNICO N-TERMINAL EM RELAÇÃO AO SÍTIO DE ATIVAÇÃO PRESENTE NA MOLÉCULA DE PLASMINOGÉNIO HUMANA NATIVA, COMBINADA DE MODO A QUE NÃO ESTEJAM PRESENTES SEQUÊNCIAS ESTRANHAS E APRESENTE CARACTERÍSTICAS DE LIGAÇÃO À LISINA E ENZIMÁTICAS SIGNIFICATIVAS ASSOCIADAS À ENZIMA NATIVA.

RESUMO**"PLASMINA MODIFICADA DE FORMA RECOMBINANTE"**

Polinucleótidos e polipéptidos relacionados com uma molécula de plasmin(ogénio) modificada de forma recombinante. A molécula de plasmin(ogénio) possui um domínio kringle único N-terminal em relação ao sítio de ativação presente na molécula de plasminogénio humana nativa, combinada de modo a que não estejam presentes sequências estranhas e apresente características de ligação à lisina e enzimáticas significativas associadas à enzima nativa.

FIG 1



DESCRIÇÃO

"PLASMINA MODIFICADA DE FORMA RECOMBINANTE"

Antecedentes da invenção

O plasminogénio humano é uma proteína de cadeia simples contendo 791 resíduos de aminoácidos. A ativação do plasminogénio em plasmina resulta de uma clivagem simples da ligação peptídica Arg561-Val562 no zimogénio. A molécula de plasmina resultante é uma protease serínica de duas cadeias, com ligação persulfureto com uma especificidade de tipo tripsina (cliva após Lys e Arg).

A cadeia pesada amino-terminal da plasmina (resíduos 1-561, ~60 kDa) é composta por cinco domínios kringle, cada um contendo aproximadamente 80 resíduos de aminoácidos. Os domínios kringle são responsáveis pelas propriedades reguladoras do plasminogénio, tais como a interação com inibidores de ativação, e.g., iões Cl^{-1} ; com estimuladores de ativação, e.g., ácido ϵ -aminocapróico; com células de mamíferos e bacterianas; e com outras proteínas, tais como o substrato fisiológico da plasmina, fibrina e inibidor de plasmina, $\alpha 2$ -antiplasmina. De todos os cinco kringles, o kringle 1 é um dos mais multi-funcional: a sua actividade de ligação à lisina demonstrou ser responsável por interação da plasmina com $\alpha 2$ -antiplasmina e fibrina.

Ver Wiman, B., et al., *Biochim. Biophys. Acta* 579: 142-154 (1979); e Lucas, M.A., et al., *J. Biol. Chem.* 258: 4249-4256 (1983).

A cadeia leve C-terminal da plasmina (resíduos 562-791, ~25kDa) é uma protease serínica típica, homóloga à tripsina e contendo a tríade catalítica de protease serínica clássica: His603, Asp646 e Ser741. O plasminogénio contém 24 pontes persulfureto e 2 sítios de glicosilação em Asn289 e Thr346.

A proteólise limitada do plasminogénio pela elastase demonstrou resultar nos três fragmentos principais (Sottrup-Jensen, L., et al., *Prog. Chem. Fibrinol. Thrombol.* 3: 191-209 (1978)). O primeiro fragmento, K1-3, inclui os primeiros três kringles e pode ser isolado em duas versões, Tyr80-Val338 e Tyr80-Val354. O segundo fragmento, K4, corresponde ao quarto kringle e inclui os resíduos Val355-Ala440. O último, fragmento C-terminal (o denominado mini-plasminogénio) inclui os resíduos Val443-Asn791 e consiste no quinto kringle e o domínio da protease serínica. O mini-plasminogénio pode ser ativado do mesmo modo que o plasminogénio, formando mini-plasmina.

Devido à estrutura complexa da molécula de plasminogénio de comprimento total, os sistemas de expressão em bactérias não provaram ser úteis para a produção de plasminogénio recombinante. O plasminogénio é

produzido na forma de corpos de inclusão insolúveis e não se pode remoldar a partir desse estado. Para além disso, a expressão do plasminogénio em células de mamífero é complicada pela ativação intracelular do plasminogénio em plasmina e a citotoxicidade resultante. A produção de plasminogénio totalmente ativo utilizando células de inseto é possível, contudo, este sistema não é adequado para a produção em grande escala devido ao baixo rendimento. Além disso, como com qualquer esquema de proteína recombinante, existe um potencial para encontrar problemas de imunogenicidade no indivíduo que recebe a proteína recombinante terapêutica.

A imunogenicidade pode ser uma barreira para a utilização eficaz e/ou eficiente de certos esquemas de proteína terapêutica recombinante. A imunogenicidade é uma série complexa de respostas a uma substância (e.g., a estrutura química de uma proteína incluindo a sequência de aminoácidos) que é percebida como estranha e pode incluir a produção de anticorpos neutralizantes e não-neutralizantes, formação de imunocomplexos, ativação complementar, ativação de mastócitos, inflamação, e anafilaxia. A imunogenicidade pode limitar a eficácia e a segurança de uma proteína terapêutica de múltiplas formas. A eficácia pode ser reduzida diretamente pela formação de anticorpos neutralizantes. A eficácia também pode ser reduzida indiretamente, uma vez que a ligação a anticorpos neutralizantes ou não-neutralizantes conduz tipicamente leads a uma

eliminação rápida do soro. Podem ocorrer efeitos colaterais graves e mesmo a morte quando surge uma reação imunitária. Resulta uma classe especial de efeitos colaterais quando os anticorpos neutralizantes reagem de forma cruzada com uma proteína endógena e bloqueiam a sua função.

Consequentemente, é desejável uma proteína recombinante modificada, possuindo as características desejáveis (e.g., regiões com estruturas químicas de tipo nativo) de plasmina/plasminogénio embora não possuindo certas características negativas e sendo capaz de produção em sistemas de expressão da proteína recombinante incluindo células bacterianas em quantidades substanciais.

O Pedido de Patente PCT WO 2007/047874 A **revela delta-plasminogénio, um plasminogénio mutante com uma deleção, no qual a porção média da molécula é removida, contudo a molécula resultante é diferente daquelas a presente invenção.**

Por outro lado, Medynski D. et al (Medynski et al. "Refolding, purification, and activation of miniplasminogen and microplasminogen isolated from *E. coli* inclusion bodies", *Protein Expression and Purification*, Academic Press, San Diego, CA, vol. 52, no. 2, 26 de outubro de 2006, páginas 395-402) **revelam um reenrolamento, purificação, e ativação de miniplasminogénio isolado a partir de corpos de inclusão de *E. coli*.**

Sumário da Invenção

Num aspeto, a presente invenção proporciona um polinucleótido que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido possuindo:

(a) um domínio kringle N-terminal simples homólogo a um domínio kringle de plasminogénio humano nativo, em que os últimos quatro resíduos de aminoácidos no domínio kringle são V, P, Q, e C; e

(b) um sítio de ativação do domínio C-terminal e domínio da protease serínica homólogos aos domínios correspondentes no plasminogénio humano; em que o polipéptido se liga à lisina imobilizada e **é capaz de se tornar ativado para enzimas de plasmina funcional após um evento de ativação que envolve, pelo menos, a clivagem proteolítica de uma ligação peptídica Arg-Val localizada entre o domínio kringle e o domínio da protease serínica.**

Noutro aspeto, a presente invenção proporciona um polipéptido **codificado pelo polinucleótido acima.**

Noutros aspetos, a presente invenção proporciona um vetor de expressão que compreende o polinucleótido da presente invenção. Numa forma de realização, o polinucleótido compreende uma sequência de nucleótidos como apresentada na SEQ ID NO: 1.

Em alguns aspetos, a presente invenção

proporciona uma célula cultivada que compreende um vetor de expressão que compreende um polinucleótido da presente invenção. Numa forma de realização, o polinucleótido compreende uma sequência de nucleótidos como apresentada na SEQ ID NO: 1. Noutra forma de realização, a célula cultivada é um organismo procariótico. Numa forma de realização, o organismo procariótico é *E. coli*.

Num aspeto, a presente invenção proporciona um método para produzir um ou mais polipéptidos de plasmina recombinante **possuindo terminais N diferentes**. O método compreende:

(a) proporcionar o polipéptido acima

(b) contatar o polipéptido proporcionado no passo

a) com uma protease em condições suficientes para clivar um ou mais ligações peptídicas formando desse modo um ou mais polipéptidos de plasmina recombinante **possuindo terminais N diferentes**. Numa forma de realização, proporcionar compreende expressar uma grelha de leitura aberta possuindo uma sequência correspondente à sequência como apresentada na SEQ ID NO: 1, ou uma sua variante degenerada, num hospedeiro adequado. Noutra forma de realização, o polipéptido possui uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 2.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma representação esquemática da

plasmina nativa após ativação por clivagem proteolítica. K1-K5 são regiões kringle 1-5; e SP é o domínio da protease serínica. " α 2-AP" é o sítio de ligação a α 2-antiplasmina no kringle 1.

A Figura 2 é uma representação esquemática de um mutante de plasminogénio da invenção com uma deleção utilizado a mesma nomenclatura que na Figura 1, e apresentando a deleção de K2-5.

A Figura 3 apresenta uma sequência de aminoácidos de plasminogénio humano, apresentando a sequência líder de 19-resíduos com os números -19 até -1, e a sequência de plasminogénio apresentada como os resíduos 1-791 (ver SEQ ID NO: 3, a sequência de cDNA para o plasminogénio humano; e SEQ ID NO: 4, a sequência de aminoácidos codificada, como apresentado na Figura 3). São apresentadas várias características, incluindo as seguintes: uma forma de realização da sequência de plasminogénio (TAL6003) (sombreado); domínios kringle 1-5 (duplo sublinhado); sítios de glicosilação Asn289 e Thr346 (a negrito); o sítio de ativação Arg-Val (R561-V562 a negrito); e sítios de ligação a lisina em kringle 1 (em sublinhado e com numeração de posição específica).

A Figura 4 apresenta comparações de sequências de polipéptidos (*i.e.*, um alinhamento gap) entre os cinco domínios kringle (1-5) do plasmin(ogénio) humano nativo. Os resíduos de aminoácidos que são idênticos àqueles da mesma posição relativa em kringle 1 são apresentados em sublinhado.

A Figura 5 apresenta um gradiente de 8-25% em

SDS-PAGE de preparação de plasmina derivada de plasma (Pista 1 = não reduzida (NR); Pista 2 = reduzida (R)) e (TAL6003)-plasmina (Pista 3 = não reduzida (NR); Pista 4 = reduzida (R)). A ativação pela estreptoquinase de plasminogénio derivado de plasma e (TAL6003)-plasminogénio em plasmina nativa e (TAL6003)-plasmina recombinante, respetivamente, resulta na formação de duas bandas correspondentes ao domínio kringle e ao domínio da protease serínica. Consequentemente, após incubação com o agente redutor ditiotreitol (DTT) antes da eletroforese, plasmina derivada do plasma e (TAL6003)-plasmina, que são uma banda única num gel em condições de redução, reduzido a duas bandas correspondentes a kringle 1 (banda inferior) e o domínio da protease serínica (banda superior) no mesmo gel em condições de não redução.

A Figura 6 é uma representação gráfica da activação de (TAL6003)-plasminogénio pela estreptoquinase.

A Figura 7 é um cromatograma apresentando ligação de (TAL6003)-plasminogénio a lisina-SEPHAROSE™ 4B: foi aplicado 0,5 mg de (TAL6003)-plasminogénio purificado na coluna de lisina-SEPHAROSE™ 4B (1 x 3 cm) equilibrada com soro fisiológico tamponado com Tris, pH 7,4. A proteína ligada foi eluída a partir da coluna por um gradiente de 0-20 mM de ácido ϵ -aminocapróico (ϵ -ACA) com um pico único. A absorvência a 280 nm e a concentração de ϵ -ACA, como uma função do volume efluente são apresentadas no gráfico.

A Figura 8 apresenta a ligação de (TAL6003)-plasminogénio a fibrina como avaliado pela sua ativação subsequente por tPA e resultante lise do coágulo.

A Figura 9 apresenta a comparação *in vitro* da eficácia trombolítica de (TAL6003)-plasmina com plasmina derivada do plasma.

A Figura 10 ilustra o padrão da ligação persulfureto de (TAL6003)-plasmina (SEQ ID NO: 2). Na figura, (X) representa uma sequência de aminoácidos RDVVLFEK.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Os presentes inventores descobriram novos polipéptidos de plasminogénio recombinantes, ou variantes destes, aqui referidos como (TAL6003)-plasminogénios que possuem características do tipo do plasminogénio nativo apesar da deleção de 4 kringles da sua estrutura. Estes (TAL6003)-plasminogénios, ou suas variantes, são zimogénios que são capazes de se tornar ativados como enzimas de plasmina funcionais (aqui referidos como (TAL6003)-plasminas) após um evento de ativação que envolve pelo menos a clivagem proteolítica de uma ligação peptídica Arg-Val localizada entre o domínio kringle e o domínio da protease serínica do zimogénio.

O (TAL6003)-plasminogénio, ou uma sua variante, da presente invenção possui ligação a fibrina e a anti-plasmina assim como propriedades de ativação do plasminogénio humano nativo de comprimento total. Para além disso, o (TAL6003)-plasminogénio possui várias características novas e desejáveis incluindo expressão de nível elevado na

produção recombinante e certas estruturas químicas da proteína idênticas ou muito semelhantes às formas que ocorrem naturalmente de plasminogénio derivado do plasma humano.

O(s) (TAL6003)-plasmin(ogénio)s de acordo com a presente invenção podem ser caracterizados pelo menos pelo seguinte:

(i) os pesos moleculares inferiores (e.g., numa forma de realização cerca de 36,911 até cerca de 37,039 Da) de (TAL6003)-plasminas criadas após a ativação dos (TAL6003)-plasminogénios resultam num aumento da atividade específica (por mg de proteína);

(ii) a falta de pelo menos dois sítios de glicosilação encontrados na proteína nativa (ver Figure 3, i.e., N289 e T346), combinada com os pesos moleculares relativamente baixos, facilita a produção recombinante desta proteína utilizando sistemas de expressão em bactérias e leveduras de custo relativamente baixo;

(iii) os (TAL6003)-plasminogénios podem ser ativados por ativadores de plasminogénio tPA, urocinase, e estreptoquinase;

(iv) a presença do domínio kringle N-terminal único homólogo a um domínio kringle do plasminogénio humano nativo preserva as propriedades de ligação à fibrina da plasmina que são importantes para a eficácia trombolítica;

(v) a presença de sítios de ligação à $\alpha 2$ -antiplasmina no domínio kringle N-terminal único homólogo a um domínio kringle de plasminogénio humano nativo permite

que as (TAL6003)-plasminas sejam inibidas rapidamente por este inibidor fisiológico da plasmina (uma característica que pode prevenir hemorragias);

(vi) o tamanho mais pequeno das (TAL6003)-plasminas pode facilitar a sua inibição pela $\alpha 2$ -macroglobulina, diminuindo ainda mais as probabilidades de complicações de hemorragia em relação à plasmina nativa. Em formas de realização particulares, a ausência de kringle 5, que retém o sítio de ligação primário a fibrin(ogénio) não digerido intato, pode permitir a utilização das (TAL6003)-plasminas com redução da eliminação do fibrinogénio em circulação;

(vii) a presença de um domínio kringle N-terminal único homólogo a um domínio kringle de plasminogénio humano nativo, em que os últimos quatro resíduos de aminoácidos no domínio kringle são V, P, Q, e C, proporciona uma ligação do tipo nativo ao domínio da protease serínica (*i.e.*, uma ligação semelhante à junção do domínio que ocorre naturalmente entre o domínio kringle 5 e o domínio da protease serínica do plasminogénio humano); e

(viii) após expressão do (TAL6003)-plasminogénio recombinante, o seu terminal N pode ser clivado novamente (*e.g.*, clivado de novo durante a ativação) para proporcionar um terminal N de tipo nativo.

De um modo geral, a invenção proporciona polipeptídeos de (TAL6003)-plasmin(ogénio) recombinante possuindo uma única região kringle N-terminal para o sítio de ativação e domínio da protease serínica, possuindo certas vantagens em relação a mini-plasmin(ogénio). Embora os

(TAL6003)-plasminogénios da invenção apenas possuam um domínio kringle, como tal, numa posição N-terminal em relação ao sítio de ativação, algumas formas de realização incluem sequências adicionais numa posição N-terminal em relação ao sítio de ativação. Sequências N-terminais adicionais podem ser derivadas daqueles das regiões kringle nativas do plasminogénio.

Os domínios kringle N-terminais da presente invenção incluem sequências N-terminal dos kringles 1 e 4 do plasmin(ogénio) nativo e seus equivalentes funcionais. Em particular, ver a discussão abaixo que proporciona orientação em relação à preservação da função nas variantes do polipéptido, incluindo a preservação dos resíduos que participam em ou influenciam a ligação à lisina.

Para além disso, formas de realização particulares dos polipéptidos da presente invenção podem apresentar imunogenicidade reduzida em virtude de estruturas de tipo nativo. Por exemplo, em algumas formas de realização, o plasminogénio recombinante da presente invenção possui um terminal N idêntico àquele que existe em formas que ocorrem naturalmente do plasminogénio derivado de plasma humano, que após ativação por estreptoquinase, produz polipéptidos de plasmina que compreendem terminais N do tipo nativo. Adicionalmente, os novos polipéptidos da presente invenção possuem uma sequência entre os domínios Kringle e da protease serínica que é semelhante à junção entre Kringle 5 e o domínio SP na plasmina humana que ocorre naturalmente.

Definições

Os termos "domínio" e "região" de um polipéptido são geralmente sinónimos como aqui utilizados, salvo indicação em contrário. Quando referidos juntamente com designações estruturais ou funcionais bem reconhecidas, tais como "kringle" ou "protease serínica", etc., esses termos irão introduzir uma característica de polipéptido relacionada com pelo menos alguma(s) característica(s) normalmente reconhecidas e entendidas como estando associadas às estruturas de polipéptido que correspondem a essas designações.

Uma "célula hospedeira cultivada", como aqui utilizada, refere-se a uma célula procariótica ou eucariótica que contém DNA heterólogo que foi introduzido na célula por qualquer meio, *e.g.*, eletroporação, precipitação com fosfato de cálcio, microinjeção, transformação, infecção viral, e semelhantes.

"Heterólogo" como aqui utilizado significa "de origem natural diferente" ou representando um estado não natural. Por exemplo, se uma célula hospedeira cultivada for transformada com um DNA ou gene derivado de outro organismo, particularmente de outra espécie, esse gene é heterólogo em relação a essa célula hospedeira cultivada, e também em relação aos descendentes da célula hospedeira cultivada que contém esse gene. De um modo semelhante,

"heterólogo" refere-se a uma sequência de nucleótidos derivada de, e inserida, no mesmo tipo de célula original natural, mas que está presente num estado não natural, e.g., um número de cópias diferentes ou sob o controlo de diferentes elementos reguladores. Para além disso, quando utilizado no contexto de uma sequência de ácidos nucleicos ou de aminoácidos, o termo "heterólogo" também se pode referir a qualquer região da sequência que tem uma origem natural diferente de outra região da mesma sequência. Por exemplo, de uma proteína recombinante compreende um domínio kringle derivado de apolipoproteín(a) e um domínio de protease serínica derivado de plasminogénio, o domínio kringle e o domínio da protease serínica são "heterólogos" um em relação ao outro, particularmente se cada domínio for derivado de uma espécie ou organismo diferente.

Uma molécula de "vetor" é uma molécula de ácido nucleico na qual pode ser inserido um ácido nucleico heterólogo que pode ser então introduzida numa célula hospedeira cultivada apropriada. Os vetores preferencialmente possuem uma ou mais origens de replicação, e um ou mais sítios nos quais o DNA recombinante pode ser inserido. Os vetores possuem frequentemente meios convenientes através dos quais as células com vetores podem ser selecionados a partir daqueles sem, e.g., genes que codificam resistência a fármacos. Vetores comuns incluem plasmídeos, genomas virais, e (principalmente em leveduras e bactérias) "cromossomas artificiais".

Como aqui utilizado, o termo "sequência de controlo de transcrição" refere-se a sequências de ácidos nucleicos, tais como sequências de iniciadores, sequências de intensificador e sequências de promotor, que induzem, repressão, ou de outra forma o controlo da transcrição das sequências de ácidos nucleicos que codificam proteínas às quais estão ligados operacionalmente.

O termo "polipéptido" é aqui utilizado indistintamente com os termos "péptido" e "proteína".

Os termos "polinucleótido" e "ácido nucleico" são aqui utilizados indistintamente, e podem referir-se a qualquer ácido nucleico que contenha a informação necessária para o objetivo indicado pelo contexto. Isto é, o ácido nucleico pode ser DNA ou RNA, seja de cadeia simples ou de cadeia dupla, ou outro ácido nucleico, desde que o polímero seja capaz de representar a informação apropriada, e.g., em relação a um péptido codificado, e pode incluir sequências complementares, e.g., cadeias de sentido e cadeias anti-sentido de polímeros de ácidos nucleicos.

O termo "variante" de um polipéptido refere-se a uma sequência de aminoácidos que é alterada em um ou mais aminoácidos. A variante pode possuir alterações "conservadoras", em que um aminoácido substituído possui propriedades estruturais ou químicas semelhantes, e.g., substituição de leucina por isoleucina. Alternativamente, uma

variante pode possuir alterações "não conservadoras", e.g., substituição de uma glicina com um triptofano. Uma variação análoga menor também pode incluir de deleção ou inserção de aminoácidos, ou ambos. Uma forma particular de um polipéptido "variante" é um polipéptido "funcionalmente equivalente", i.e., um polipéptido que apresenta actividade substancialmente semelhante *in vivo* ou *in vitro* como os exemplos do polipéptido da invenção, como descrito em maior detalhe abaixo. Orientação na determinação de quais os resíduos de aminoácidos que podem ser substituídos, inseridos, ou removidos sem eliminar a atividade biológica ou imunológica pode ser encontrada utilizando programas de computador bem conhecidos na técnica, por exemplo, o software DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Para além disso, é fornecida abaixo orientação específica, incluindo aquela que é fornecida nas referências citadas que são aqui incorporadas por referência na sua totalidade.

Os termos "N-terminal" e "C-terminal" são aqui utilizados para designar a posição relativa de qualquer sequência de aminoácidos ou domínio de polipéptido ou estrutura á qual são aplicados. O posicionamento relativo será óbvio a partir do contexto. Isto é, uma característica "N-terminal" estará localizada pelo menos mais próxima do terminal N da molécula de polipéptido do que outra característica discutida no mesmo contexto (sendo a outra característica possivelmente referida como "C-terminal" em relação à primeira característica). De um modo semelhante, os termos "5'" e "3'" podem ser aqui utilizados para

designar posições relativas das características dos polinucleótidos.

Os polipéptidos aqui referidos como possuindo um domínio N-terminal "homólogo a um domínio kringle do plasminogénio humano nativo" apresenta características estruturais e funcionais semelhantes aos domínios kringle nativos do plasminogénio. Para além disso, os polipéptidos aqui referidos como possuindo um domínio N-terminal "homólogo ao kringle 1" apresentam características semelhantes ao kringle 1 nativo, pelo menos até ao ponto em que os polipéptidos podem possuir uma afinidade mais elevada para os ácidos ω -aminocarboxílicos (e homólogos funcionais tais como o ácido *trans*-4 aminometilciclo-hexano-1-carboxílico, um ácido cíclico) do que o kringle 5. Ver, e.g., Chang, Y., et al., *Biochemistry* 37: 3258-3271 (1998), aqui incorporado por referência, para condições e protocolos para a comparação de ligação de polipéptidos de domínio kringle isolado ao ácido 5-aminopentanóico (5-APnA); ácido 6-amino-hexanóico (6-AHxA), também conhecido como ácido ϵ -aminocapróico (ϵ -ACA); ácido 7-amino-heptanóico (7-AHpA); e ácido *trans*-4-aminometilciclo-hexano-1-carboxílico (t-AMCHA).

Referências aos domínios kringle "homólogos a kringle 4" são definidas de um modo semelhante, como referido acima em relação à frase "homólogo a kringle 1." Isto é, eles apresentam características funcionais semelhantes a kringle 4 do plasminogénio humano nativo como

discutido acima. Estes polipéptidos também se ligam à lisina imobilizada como descrito acima.

Os polipéptidos da invenção ligam-se à lisina imobilizada. Como aqui utilizada, a frase "ligação à lisina imobilizada" significa que os polipéptidos assim caracterizados são retardados no seu progresso em relação ao miniplasminogénio quando sujeito a cromatografia em coluna utilizando lisina-SEPHAROSE™ como o meio cromatográfico. Tipicamente, os polipéptidos da invenção podem ser eluídos a partir desses meios cromatográficos (resinas com afinidade para a lisina) utilizando soluções que contêm o ligando específico, e.g., ϵ -ACA, como eluentes.

Para além disso, adicionalmente a Chang *et al.*, *supra*, podem ser consultadas outras referências pelos especialistas na técnica para determinar que resíduos podem ser variados por substituição conservadora ou não conservadora, deleção, ou adição para produzir um mutante de deleção no âmbito da presente invenção. Por exemplo, as seguintes referências proporcionam informação em relação a resíduos particulares dos domínios kringle nativos que podem ser importantes para a ligação de ácidos ω -aminocarboxílicos: Pat. U.S. Nº. 6 538 103 atribuído a Ji, *et al.*; Pat. U.S. Nº. 6 218 517 atribuído a Suzuki; Douglas, J.T., *et al.*, *Biochemistry* 41(10): 3302-10 (2002); Zajicek, J., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 301(2): 333-47 (2000); Lee, H., *et al.*, *Arch Biochem Biophys.* 375(2): 359-63 (2000); Castellino, F. e S. McCance, *Ciba Found Symp.* 212:

46-60 (1997); McCance, S., et al., *J. Biol. Chem.* 269: 32405-32410 (1994); Rejante, M.R. e M. Llinas, *Eur. J. Biochem.* 221(3): 939-49 (1994); Wu, T.P., et al., *Blood Coagul. Fibrinolysis* 5(2): 157-66 (1994); Hoover, C.J., et al., *Biochemistry* 32(41): 10936-43 (1993); Menhart, N., et al., *Biochemistry* 32: 8799-8806 (1993); Thewes, T., et al., *J. Biol. Chem.*, 265 (7): 3906-3915 (1990); Novokhatny, V., et al., *Thromb Res.* 53(3): 243-52 (1989); Motta, A., et al., *Biochemistry* 26(13): 3827-36 (1987); Novokhatny, V., et al., *J. Mol. Biol.* 179: 215-232 (1984); Lerch, P.G., et al., *Eur. J. Biochem.* 107(1): 7-13 (1980); Sottrup-Jensen, L., et al., *Prog. Chem. Fibrinol. Thrombol.* 3: 191-209 (1978); e Wiman, B. e D. Collen, *Nature* 272: 549-545 (1978), todos aqui incorporados por referência na sua totalidade.

Devido ao fato de os presentes inventores terem reconhecido que pode ser preparada uma molécula de plasmin(ogénio) valiosa, simplificada possuindo um único domínio kringle N-terminal possuindo caraterísticas funcionais vantajosas (que podem ser avaliadas, em parte, testando a ligação da lisina imobilizada como aqui descrito), a presente invenção pode englobar outros domínios de ligação à fibrina ou regiões N-terminais em relação ao sítio de ativação. Por exemplo, a invenção pode incluir polipéptidos nos quais o domínio da protease serínica da plasmina está ligado a um kringle de ligação a fibrina selecionado a partir de um grupo incluindo, mas não limitado a, kringle 4 de plasminogénio humano, kringle 2 de

tPA, ou um kringle de apolipoproteína(a). Para além disso, a invenção pode incluir polipéptidos nos quais um domínio da protease serínica da plasmina é ligado a qualquer um de outros módulos de ligação a fibrina conhecidos, tais como o domínio de "dedo" de tPA ou fibronectina, ou o fragmento FAB de IgG específico para a fibrina.

Em alguns aspetos, os polipéptidos da presente invenção possuem estruturas químicas da proteína (e.g., terminal N de tipo nativo e junção do tipo nativo entre o kringle e o domínio da protease serínica) que são idênticas às estruturas químicas encontradas nas formas que ocorrem naturalmente de plasmin(ogénio) derivado de plasma humano. Sem estar preso a uma teoria particular, acredita-se que certas características de uma proteína podem contribuir para a sua imunogenicidade, incluindo mas não limitado à sua sequência de aminoácidos. Consequentemente, a presente invenção proporciona uma proteína terapêutica eficaz baseada no (TAL6003)-plasminogénio recombinante reduzindo preventivamente a imunogenicidade potencial de (TAL6003)-plasminogénio através da incorporação de sequências de aminoácido que se assemelham às sequências do plasminogénio humano nativo.

Num aspeto, o polipéptido do plasminogénio recombinante (TAL6003) da presente invenção compreende (a) um domínio homólogo N-terminal único homólogo a um domínio kringle do plasminogénio humano nativo, em que os últimos quatro resíduos de aminoácidos no domínio kringle são V, P,

Q, e C; e (b) um sítio de ativação do domínio C-terminal e domínio da protease serínica homólogo aos domínios correspondentes no plasminogénio humano; em que o polipéptido se liga à lisina imobilizada e **é capaz de se tornar ativado em enzimas de plasmina funcionais após um evento de ativação que envolve pelo menos a clivagem proteolítica de uma ligação peptídica Arg-Val localizada entre o domínio kringle e o domínio da protease serínica.**

Os polipéptidos do (TAL6003)-plasminogénio recombinante da presente invenção podem ser ativados por alguém com uma especialidade ordinária na técnica para proporcionar um polipéptido de (TAL6003)-plasmina. Numa forma de realização, o polipéptido da (TAL6003)-plasmina apresenta uma atividade fibrinolítica que é inibida por $\alpha 2$ -antiplasmina a uma taxa de inibição que é pelo menos cerca de 5 vezes mais rápida do que a taxa de inibição da atividade fibrinolítica da mini-plasmina por $\alpha 2$ -antiplasmina.

Em algumas formas de realização, o polipéptido possui uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 2, e suas substituições conservadoras. Noutras formas de realização, o polipéptido possui um resíduo de arginina num análogo de posição relativa ao da posição 85 de uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2.

Por exemplo, o (TAL6003)-plasminogénio descrito

nesta invenção faz uso de modificações de resíduos de aminoácidos na região de junção que une o domínio kringle único e o domínio da protease serínica. Consequentemente, esta junção entre os dois domínios tem uma maior semelhança com a junção que ocorre naturalmente entre o domínio kringle 5 e o domínio da protease serínica do plasminogénio humano.

Noutra forma de realização, o (TAL6003)-plasminogénio descrito nesta invenção compreende ainda uma sequência N-terminal de tipo nativo. O (TAL6003)-plasminogénio produzido de forma recombinante pode ser removido por clivagem após ativação para proporcionar polipéptidos de (TAL6003)-plasmina recombinante também possuindo terminais N de tipo nativo.

Em formas de realização particulares, os resíduos em certas posições do domínio kringle N-terminal único do (TAL6003)-plasminogénio são conservados em relação ao kringle 1 do plasminogénio humano nativo. Estes podem ser os resíduos em posições associadas com pontes persulfureto e ligação a lisina, e incluem Cys84, Cys105, Cys133, Cys145, Cys157, e Cys162, e Pro136-Pro140, Pro143-Tyr146, e Arg153-Tyr156, respetivamente (posições numeradas como apresentado na Figura 3). Adicionalmente, formas de realização particulares da invenção podem ser caracterizadas quimicamente por contraste com mini plasmin(ogénio) que possui uma composição de domínio análogo (*i.e.*, kringle-protease serínica (K-SP) (ver Sottrup-Jensen, L., *et al.*, *Progress*

in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol. 3, (Eds: J. F. Davidson, *et al.*) Raven Press, New York (1978)) mas, *inter alia*, não tem uma arginina (Arg) numa posição relativa análoga á da posição 85 de uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2. Em algumas formas de realização, o (TAL6003)-plasminogénio da invenção compreende um domínio kringle N-terminal único compreendendo um resíduo Arg numa posição relativa análogo ao da posição 85 de uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2. Exemplos não limitantes de uma posição relativa análoga à da posição 85 de uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2 incluem as posições Arg(153), Arg(234), Arg(324), e Arg(426) de uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4.

A caracterização do domínio kringle N-terminal único do (TAL6003)-plasminogénio como "N-terminal" significa apenas que o domínio está presente N-terminal em relação ao sítio de ativação e não significa que não estejam presentes outros resíduos de aminoácidos N-terminais em relação ao próprio domínio. Para além disso, o número e a identidade de resíduos interpostos entre o resíduo de cisteína mais C-terminal do domínio kringle N-terminal único (*i.e.*, o resíduo Cys mais C-terminal apresentado na Figura 4) e o sítio de ativação do plasminogénio pode ser variado sem nos afastarmos do âmbito da presente invenção. Um dos especialistas na técnica será capaz de determinar estas variações que alcançam os benefícios da invenção (ligação do tipo kringle 1 de ácidos

ω aminocarboxílicos, sem aumentar substancialmente o tamanho do mutante de deleção ou introdução de sítios de glicosilação potencialmente problemáticos) sem experimentação indesejada baseada na descrição aqui apresentada e nas referências aqui citadas para orientação em relação à função e à estrutura de kringle 1.

Consequentemente, a invenção refere-se a polinucleótidos, polipéptidos, métodos recombinantes para produzir os polipéptidos, vetores contendo os polinucleótidos, sistemas de expressão para produzir os polipéptidos, e células hospedeiras cultivadas compreendendo esses sistemas de expressão.

Como referido, num aspeto, a invenção refere-se a um polinucleótido que codifica o polipéptido aqui descrito ou um polipéptido possuindo substituições de aminoácidos conservadoras desta. É fornecida orientação em relação à seleção de substituições de aminoácidos "conservadoras" em mais detalhe abaixo. Numa forma de realização, o polinucleótido é DNA.

Noutro aspeto, a invenção refere-se a células que contêm pelo menos um polinucleótido da invenção.

Numa forma de realização, o polinucleótido compreende a sequência de nucleótidos como apresentada na SEQ ID NO: 1. Noutras formas de realização, o polipéptido

compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 2.

Polinucleótidos

Os polinucleótidos da invenção incluem variantes que possuem substituições, deleções, e/ou adições que podem envolver um ou mais nucleótidos. As variantes podem ser alteradas em regiões codificantes, regiões não codificantes, ou ambas. Alterações nas regiões codificantes podem produzir substituições, deleções, ou adições de aminoácidos conservadoras ou não conservadoras. Especialmente preferidas entre estas estão substituições, adições e deleções silenciosas, que não alteram as propriedades e atividades da proteína (TAL6003)-plasmin(ogénio) ou porções desta. Também especialmente preferidas a este respeito são substituições conservadoras (*ver abaixo*).

Numa forma de realização, a molécula de ácido nucleico da presente invenção compreende um polinucleótido possuindo uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2. Noutras formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende um polinucleótido possuindo a sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID NO: 1, ou uma sua variante degenerada.

Obviamente, também podem ser utilizadas técnicas tradicionais de biologia molecular, microbiologia, e ácido

nucleico recombinante para produzir os polinucleótidos da invenção. Estas técnicas são bem conhecidas e são explicadas em, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel, ed., Vols. I, II, e III (1997); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); *DNA Cloning: A Practical Approach*, D. N. Glover, ed., Vols. I e II (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, M. L. Gait, ed. (1984); *Nucleic Acid Hybridization*, Hames e Higgins, eds. (1985); *Transcription and Translation*, Hames e Higgins, eds. (1984); *Animal Cell Culture*, R. I. Freshney, ed. (1986); *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press (1986); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning"; a série, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc. (1984); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, J. H. Miller e M. P. Calos, eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); e *Methods in Enzymology*, Wu e Grossman e Wu, eds., respectivamente, Vols. 154 e 155, todos aqui incorporados por referência.

Vetores e Células Hospedeiras Cultivadas

A presente invenção também se refere a vetores que incluem as moléculas de ácido nucleico isolado da presente invenção, células hospedeiras cultivadas que são geneticamente modificadas com os vetores recombinantes, e a produção dos polipéptidos de (TAL6003)-plasmin(ogénio) por técnicas recombinantes.

Podem ser introduzidas construções recombinantes em células hospedeiras cultivadas utilizando técnicas bem conhecidas tais como infecção, transdução, transfeção, transveção, eletroporação, e transformação. O vetor pode ser, por exemplo, um vetor fágico, plasmídico, viral ou retroviral. Os vetores retrovirais podem ser competentes para a replicação ou defeituosos para a replicação. No último caso, a propagação viral irá geralmente ocorrer apenas em células hospedeiras complementares cultivadas.

Os polinucleótidos podem ser unidos a um vetor contendo um marcador de seleção para a propagação num hospedeiro cultivado. De um modo geral, um vetor plasmídico é introduzido num precipitado, tal como um precipitado de fosfato de cálcio, ou num complexo com um lípido carregado. Se o vetor for um vírus, pode ser embalado *in vitro* utilizando um linha celular de empacotamento apropriada e depois transduzido para células hospedeiras cultivadas.

São preferidos vetores compreendendo regiões de controlo de atuação em *cis* ao polinucleótido de interesse. Os factores de transacção apropriados podem ser fornecidos pelo hospedeiro cultivado, fornecidos ou um vetor de complementação, ou fornecido pelo próprio vetor após introdução no hospedeiro cultivado.

Em certas formas de realização a este respeito, os vetores proporcionam expressão específica, que pode ser indutível e/ou específica para o tipo de célula. São

particularmente preferidos entre vetores aqueles que são indutíveis por fatores ambientais que são fáceis de manipular, tais como temperatura e aditivos de nutrientes.

Vetores de expressão úteis na presente invenção incluem vetores cromossômicos, epissômicos e derivados de vírus, e.g., vetores derivados de plasmídeos bacterianos, bacteriófagos, epissomas de levedura, elementos de cromossoma de levedura, vírus tais como baculovírus, vírus papova, vírus vaccinia, adenovírus, vírus da varíola aviária, vírus da pseudo-raiva e retrovírus, e vetores derivados das suas combinações, tais como cosmídeos e fagemídeos.

As inserções de DNA devem ser ligadas operacionalmente a um promotor apropriado, tal como o promotor o promotor do fago lambda PL, os promotores lac, trp e tac de *E. coli*, os promotores precoce e tardio de SV40 e os promotores de LTRs retrovirais, para mencionar apenas alguns. Outros promotores adequados serão conhecidos do especialista. As construções de expressão irão ainda conter sítios para iniciação de transcrição, terminação e, na região transcrita, um sítio de ligação ao ribossoma para tradução. A porção codificante dos transcritos maduros expressos pelas construções podem incluir uma tradução que começa no princípio e um codão de terminação (UAA, UGA, ou UAG) posicionado apropriadamente no fim do polipéptido a ser traduzido.

Como indicado, os vectores de expressão incluirão preferencialmente pelo menos um marcador de seleção. Esses marcadores incluem di-hidrofolato redutase ou resistência a neomicina para uma cultura de células eucarióticas e genes de resistência a tetraciclina ou ampicilina para cultura em *E. coli* e outras bactérias. Exemplos representativos de hospedeiros cultivados apropriados incluem, mas não estão limitados a, células bacterianas, tais como células de *E. coli*, *Streptomyces* e *Salmonella typhimurium*; células de fungos, tais como células de leveduras; células de insetos tais como células de *Drosophila* S2 e *Spodoptera* Sf9; células animais tais como células CHO, COS e de melanoma de Bowes; e células vegetais. Meios de cultura e condições apropriados para as células hospedeiras cultivadas acima descritas são conhecidos na técnica.

Entre os vetores preferidos para utilização em bactérias incluem e.g., pET24b ou pET22b disponíveis em Novagen, Madison, WI (pET-24b(+) e pET-22b(+) = pET Expression System 24b (Cat. No. 69750) e 22b (Cat. No. 70765), respectivamente, EMD Biosciences, Inc., Novagen Brand, Madison, WI; ver seção de informação de produto em relação a pET-24b e pET-22b para detalhes em relação ao vetor), pQE70, pQE60 e pQE-9, disponível em Qiagen Inc., Valencia, CA; vetores pBS, vetores PHAGESCRIPT, vetores BLUESCRIPT, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponíveis em Stratagene, LaJolla, CA; e ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponíveis em Pharmacia (agora Pfizer, Inc., New York, NY). Entre outros vetores eucarióticos preferidos

são pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 e pSG disponíveis em Stratagene; e pSVK3, pBPV, pMSG e pSVL disponíveis em Pharmacia. Outros vetores adequados serão rapidamente óbvios para os especialistas na técnica.

Promotores bacterianos adequados para utilização na presente invenção incluem os promotores de *E. coli lacI* e *lacZ*, os promotores T3 e T7, o promotor *gpt*, os promotores lambda PR e PL, e o promotor *trp*. Promotores eucarióticos adequados incluem o promotor precoce imediato de CMV, o promotor da timidina cinase HSV, os promotores precoce e tardio de SV40, os promotores de LTRs retrovirais, tais como aqueles do vírus do sarcoma de Rous (RSV), e promotores de metalotioneína, tais como o promotor da metalotioneína-I de murganho.

A introdução de uma construção de vetor na célula hospedeira cultivada pode ser realizada através de transfeção com fosfato de cálcio, transfeção mediada por DEAE-dextrano, transfeção mediada por lípido catiónico, eletroporação, transdução, infecção, ou outros métodos. Esses métodos são descritos em muitos manuais de laboratório convencionais, tais como Davis *et al.*, *Basic Methods In Molecular Biology*, 2nd Edition (1995).

A transcrição do DNA que codifica os polipéptidos da presente invenção por eucariotas superiores pode ser aumentada inserindo uma sequência de intensificador no vector. Os intensificadores são elementos de DNA de atuação

cis, normalmente cerca de 10 até 300 pb que atuam para aumentar a actividade de transcrição de um promotor num dado tipo de célula hospedeira cultivada. Exemplos de intensificadores incluem o intensificador de SV40, que está localizado no lado tardio da origem de replicação a 100 até 270 pb, o intensificador promotor precoce de citomegalovírus, o intensificador de polioma no lado tardio da origem de replicação, e intensificadores de adenovírus.

Para a secreção da proteína traduzida para o lúmen do retículo endoplasmático, para o espaço periplásmico ou para o ambiente extracelular, sinais de secreção apropriados podem ser incorporados no polipéptido expresso. Os sinais podem ser endógenos para o polipéptido ou podem ser sinais heterólogos.

O polipéptido pode ser expresso numa forma modificada, tal como uma proteína de fusão, e pode incluir não apenas sinais de secreção, mas também regiões funcionais heterólogas adicionais. Por exemplo, uma região de aminoácidos adicionais, particularmente aminoácidos carregados, podem ser adicionados ao terminal N, por exemplo, o polipéptido para melhorar a estabilidade e a persistência na célula hospedeira cultivada, durante a purificação, ou durante o manuseamento e o armazenamento subsequentes. Também podem ser adicionadas unidades peptídicas ao polipéptido para facilitar a purificação. Essas regiões podem ser removidas antes da preparação final do polipéptido. As adições das unidades peptídicas aos

polipéptidos para produzir secreção ou excreção, para melhorar a estabilidade e para facilitar a purificação, entre outras, são técnicas familiares e de rotina na arte. Uma proteína de fusão preferida compreende uma região heteróloga de imunoglobulina que é útil para solubilizar proteínas. Por exemplo, EP 0 464 533 A1 (homólogo Canadano, 2 045 869) revela proteínas de fusão compreendendo várias porções da região constante de moléculas de imunoglobulina juntamente com outra proteína humana ou parte desta. Em muitos casos, a parte Fc numa proteína de fusão é completamente vantajosa para utilização em terapia e diagnóstico e isso resulta, por exemplo, em propriedades farmacocinéticas melhoradas. Por outro lado, para algumas utilizações deve ser desejável ser capaz de remover a parte Fc após a proteína de fusão ter sido expressa, detetada, e purificada do modo vantajoso descrito. Este é o caso quando a porção Fc demonstra ser um impedimento para utilização em terapia e diagnóstico, por exemplo, quando a proteína de fusão se destina a ser utilizada como antigénio para imunizações. Na descoberta de fármacos, por exemplo, as proteínas humanas foram fundidas com porções Fc para o objetivo de ensaios de rastreio de elevado rendimento (tais como o recetor hIL5, para identificar antagonistas de hIL-5). Ver, Bennett, D., et al., *J. Molecular Recognition*, 8: 52-58 (1995) e Johanson, K. et al., *J. Biol. Chem.* 270(16): 9459-9471 (1995).

O (TAL6003)-plasminogénio pode ser recuperado e purificado a partir de culturas de células recombinantes

através de métodos bem conhecidos incluindo aqueles especificamente aqui descritos nos exemplos. Os polipéptidos da presente invenção incluem produtos naturalmente purificados, produtos de processos sintéticos químicos, e produtos produzidos por técnicas recombinantes a partir de um hospedeiro procariótico ou eucariótico cultivado, incluindo, por exemplo, células bacterianas, de leveduras, de plantas superiores, de insetos e de mamífero. Adicionalmente, os polipéptidos da invenção também podem incluir um resíduo de metionina modificado inicial, em alguns casos como um resultado de processos mediados pelo hospedeiro.

Também está contemplado que os polipéptidos úteis na produção dos "polipéptidos isolados" da invenção podem ser produzidos através de métodos de síntese em fase sólida. Ver Houghten, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5131-5135 (1985); e Pat. U.S. Nº. 4 631 211 atribuída a Houghten *et al.* (1986).

Os polipéptidos da presente invenção podem ser proporcionados numa forma isolada. Por "polipéptido isolado" entende-se um polipéptido removido do seu ambiente nativo. Assim, um polipéptido produzido e/ou contido numa célula hospedeira recombinante cultivada é considerado isolado para os objetivos da presente invenção. Também é entendido, como "polipéptidos isolados", que são polipéptidos que foram purificados, parcialmente ou substancialmente, a partir de um hospedeiro recombinante cultivado.

EXEMPLOS

Design de Vetor de Expressão

A sequência de aminoácidos para (TAL6003)-plasminogénio é apresentada na SEQ ID NO: 2. Um polinucleótido possuindo a sequência de nucleótidos que codifica o (TAL6003)-plasminogénio foi otimizada para os códons para expressão em *E. coli* e estabilidade de mRNA para proporcionar a sequência de DNA como apresentada na SEQ ID NO: 1. Este polinucleótido foi clonado nos sítios *NdeI* e *BamHI* do vetor de expressão em *E. coli* pET24b(+) (Novagen; Madison, WI) para produzir a proteína citossólica.

Como ilustrado na Tabela 1, a expressão em bactérias (e.g., *E. coli*) proporcionou um polipéptido de (TAL6003)-plasminogénio recombinante possuindo a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 2 (i.e., um (TAL6003)-plasminogénio recombinante com uma metionina N-terminal (i.e., M1) imediatamente antes do resíduo de aminoácidos arginina (i.e., R2) correspondendo à arginina na posição 70 (i.e., R70) da sequência de aminoácidos do plasminogénio humano nativo apresentada na SEQ ID NO: 4 (ver também, e.g., Fig. 3). Um tal produto recombinante foi suscetível a posterior clivagem para produzir proteínas adicionais possuindo terminais N diferentes incluindo uma proteína com uma lisina N-terminal (i.e., K10) ou valina (i.e., V11) correspondendo, respetivamente, à lisina na

posição 78 (*i.e.*, K78) ou a valina na posição 79 (*i.e.*, V79) de plasminogénio humano nativo.

Tabela 1: Terminais N do plasmin(ogénio) nativo (<i>e.g.</i>, baseado na SEQ ID NO: 4) e (TAL6003)-plasmin(ogénio) (<i>e.g.</i>, baseado na SEQ ID NO: 2, ou uma variante desta)	
Plasminogénio Nativo compreendendo a sequência líder de 19 aminoácidos (<i>e.g.</i> , baseado na SEQ ID NO: 4):	
$\begin{array}{ccccccc} & & \downarrow & & \downarrow & & \downarrow \downarrow \\ M^{-19}EHKE \dots E^{01}PLDDY \dots M^{69}R^{70}DVVLFEEKK^{78}V^{79}YLSEC \end{array}$	
"Lys-Plasminogénio" Nativo (<i>i.e.</i> , clivagem da sequência líder):	
$\begin{array}{ccccccc} & & \downarrow & & \downarrow \downarrow & & \\ E^{01}PLDDY \dots M^{69}R^{70}DVVLFEEKK^{78}V^{79}YLSEC \dots \end{array}$ (ver SEQ ID NO: 15)	
Espécie de Plasmina nativa possivelmente baseada na clivagem, se existir, de Lys-Plasminogénio:	
(ver SEQ ID NO:14)	$M^{69}R^{70}DVVLFEEKK^{78}V^{79}YLSEC$
(ver SEQ ID NO:13)	$K^{78}V^{79}YLSEC \dots \dots$
(ver SEQ ID NO:12)	$V^{79}YLSEC \dots \dots$
Polipéptidos do (TAL6003)-plasminogénio recombinante da presente invenção:	
(<i>e.g.</i> , baseado na SEQ ID NO: 2)	
$\begin{array}{ccccccc} & & \downarrow \downarrow & & & & \\ M^{01}R^{02}DVVLFEEKK^{10}V^{11}YLSEC \dots \end{array}$	
Proteínas adicionais baseadas noutra clivagem de um (TAL6003)-plasminogénio (<i>e.g.</i> , baseado em SEQ ID NO: 2):	
(ver SEQ ID NO:11)	$K^{10}V^{11}YLSEC \dots \dots$
(SEQ ID NO:5)	$V^{11}YLSEC \dots \dots$
↓ indica sítios potenciais de clivagem.	

Expressão e Purificação de (TAL6003)-plasminogénio

O vetor de expressão compreendendo o DNA que codifica o (TAL6003)-plasminogénio foi transformado numa variedade de células incluindo BL21(DE3) RIL (Stratagene, La Jolla, CA), BL21(DE3) (genótipo: F^{-} ompT hsdSB (rB^{-} mB^{-}) gal dcm (DE3)) (EMB Biosciences, Inc., San Diego, CA), e BLR(DE3) (genótipo: F^{-} ompT hsdSB (rB^{-} mB^{-}) gal dcm (DE3) Δ (srl $^{-}$ recA)306::Tn10(TetR)), e a sobre-expressão da proteína após indução por 1 mM IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) foi analisada por SDS-PAGE. As estimativas da expressão foram com culturas de células de pelo menos cerca de 250 mg/L em frascos com agitação.

O tipo celular BL21(DE3) RIL é modificado para expressar tRNAs de *E. coli* raros codificando Arg, Ile, e Leu. Para além disso, tanto BL21(DE3) como BLR(DE3) são a estirpe B de *E. coli* que é classificada como não patogénica para humanos e animais baseado na ausência de virulência e factores de colonização. As células BLR(DE3) não possuem o gene recA para recombinação de DNA, e indução do fago lambda não foi reportado com estas células. Um banco de células para investigação da construção do (TAL6003)-plasminogénio em células BLR(DE3) foi produzido e testado para a pureza, identidade, e indução de bacteriófagos nos Charles River Laboratories (Malvern, PA). O teste confirmou a identidade e a pureza do banco de células para investigação e as células passaram o teste de indução de fagos sem fagos observáveis (resultados não apresentados).

A produção do (TAL6003)-plasminogénio (*i.e.*, baseada na SEQ ID NO: 2) foi confirmada em expressão a maior escala em que as células foram lisadas e ambos a proteína solúvel e os corpos de inclusão purificados foram examinados por SDS-PAGE.

O seguinte protocolo típico foram utilizados para a expressão de (TAL6003)-plasminogénio:

Foi utilizada uma colónia isolada de células de *E. coli* (*e.g.*, BL21(DE3) RIL, BL21(DE3), ou BLR(DE3) contendo o vetor do (TAL6003)-plasminogénio para inocular 5 mL de LB/canamomicina (30 mg/mL) e foi incubado para 8 horas a 37 °C num agitador. Após isso, foi retirada uma amostra de 50 mL da suspensão bacteriana cultivada para posterior em meio fresco. O procedimento foi repetido após 16 horas com 6 mL de cultura de bactérias e 250 mL do meio. As culturas foram cultivadas a 37 °C com agitação até uma DO₆₀₀ nm de ~1,0, e foi adicionado IPTG para uma concentração final de 1 mM. As culturas foram cultivadas durante mais 5 horas. As células foram recolhidas por centrifugação a 5 000 x g e os sedimentos celulares foram dissolvidos em Tris a 20 mM pH 8,0 contendo EDTA a 20 mM e congelados a -80 °C.

Para purificar o (TAL6003)-plasminogénio, os sedimentos celulares foram descongelados e foi adicionado também até o volume da solução ser aproximadamente 1/20 do volume da cultura de células original. Após este

procedimento foi adicionada lisozima para uma concentração final de 0,5 mg/mL e as células foram agitadas rapidamente a 4 °C durante 10-15 minutos. Depois, foi adicionado Triton X-100 para uma concentração final de 1% e a agitação prosseguiu durante mais 10 min. Foram adicionados DNase I (0,05 mg/mL) e $MgCl_2$ (2,5 mM) e a agitação continuou a 4 °C durante 30 minutos ou até a solução já não ser viscosa. A solução final foi centrifugada a 4 °C durante 30 min a 15,000 x g e o sobrenadante foi eliminado.

O sedimento celular foi lavado três vezes com solução de lavagem (50 mM Tris-HCl, pH 7,4 contendo EDTA a 10 mM, Triton-X-100 a 1%, e ureia a 0,5 M), e o sedimento final foi dissolvido em 40 mL de tampão de extração (PBS, pH 7,4 contendo EDTA a 10 mM, DTT a 20 mM, e guanidina-HCl a 6 M) e armazenados a 4 °C durante a noite. Após 16 horas, a solução foi centrifugada durante 30 minutos a 15 000 x g para remover sólidos e o sobrenadante foi lentamente adicionado à solução de redobragem (Tris-HCl a 50 mM, pH 8,3, guanidina-HCl 3,5 M, arginina-HCl a 0,5 M, EDTA a 10 mM, GSH a 3 mM, GSSG a 0,3 mM) durante agitação a 4 °C. O processo de redobragem foi realizado a uma concentração de proteína de cerca de 0,29 g/L.

A solução de redobragem foi mantida durante 2 dias a 4 °C sem ser perturbada e depois dialisada contra um volume de 8 vezes de Tris-HCl a 0,1 M pH 8,0 contendo EDTA a 10 mM, NaCl a 0,15 M, arginina-HCl a 0,15 M, durante um período de 8-10 horas com alterações frequentes da solução tampão.

A solução de proteína foi então removida da diálise e concentrada utilizando filtros AMICON com o limiar de retenção da membrana de 10 kDa até aproximadamente 10-20 mL e dialisada durante a noite contra um volume de 100 vezes de Tris a 0,1 M, pH 8.0 contendo EDTA a 10 mM, NaCl a 0,15 M. Este material foi centrifugado para remover particulados, e depois foi passado por resina de afinidade para a lisina (Lisina-SEPHAROSE™ 4B; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). O (TAL6003)-plasminogénio foi eluído da resina utilizando soro fisiológico tamponado com Tris, pH 8,0 contendo 0,2 M de ácido épsilon aminocapróico (ϵ -ACA).

Tipicamente, podem ser isolados 80 mg de corpos de inclusão a partir de 1 litro de cultura de células e podem ser eluídos 40 mg no passo de cromatografia de lisina-SEPHAROSE.

Propriedades do (TAL6003)-plasminogénio

O (TAL6003)-plasminogénio purificado surge como uma banda na região dos 35-40 kDa por análise em SDS-PAGE da proteína reduzida (tratada com ditioneitol) e não reduzida. A sua massa molecular, determinada por espectrometria de massa MALDI, foi de cerca de 38 140 Da, que é próximo do valor esperado.

Para determinar a taxa de ativação do (TAL6003)-

plasminogénio por estreptoquinase, foi misturado 1 mg/mL de (TAL6003)-plasminogénio recombinante com estreptoquinase a uma proporção de 1:100 de (TAL6003)-plasminogénio para estreptoquinase e incubada à temperatura ambiente a pH 7. Em vários pontos de tempo, as amostras foram removidas e interrompidas com tampão SDS-Page e analisadas em SDS-PAGE reduzido seguido por densitometria para determinar a conversão da molécula de (TAL6003)-plasminogénio de uma cadeia numa (TAL6003)-plasmina de duas cadeias. A percentagem de ativação do (TAL6003)-plasminogénio por estreptoquinase é apresentada na Figura 6 como perda do (TAL6003)-plasminogénio de comprimento total ao longo do tempo como determinado por SDSPAGE.

Para confirmar a funcionalidade de kringle 1, os autores determinaram a ligação do TAL6003-plasminogénio à lisina-SEPHAROSE™ 4B. Como apresentado na Figura 7, o (TAL6003)-plasminogénio ligado a lisina-SEPHAROSE™ e pode ser eluído da coluna através de um gradiente 0-20 mM de ϵ -ACA como um único pico a cerca de 4 mM. A capacidade do (TAL6003)-plasminogénio redobrado para se ligar a lisina-SEPHAROSE™ indica que o domínio kringle da molécula é dobrado adequadamente e o sítio de ligação à lisina está totalmente ativo.

Para posterior confirmação da funcionalidade do kringle 1, a ligação de ϵ -ACA ao (TAL6003)-plasminogénio foi medida monitorizando as alterações associadas na fluorescência da proteína como descrito por Matsuka *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 190: 93-97 (1990) e Douglas *et al.*, *J.*

Biochemistry 41: 3302-3310 (2002), todos aqui incorporados por referência. A ligação de ϵ -ACA ao kringle 1 do (TAL6003)-plasminogénio resulta numa diminuição na fluorescência, provavelmente devido à interrupção dos resíduos de triptofano que são parte do sítio de ligação à lisina.

Para monitorizar este processo, foram adicionadas frações de 4 μ L até 16 p.L de uma solução concentrada de ϵ -ACA a 2 mL de 5 mM de (TAL6003)-plasminogénio em tampão Tris a 50 mM contendo NaCl a 20 mM, pH 8,0, 25 °C. A fluorescência foi monitorizada a um comprimento de onda de excitação de 298 nm e um comprimento de onda de emissão de 340 nm num espectrofotómetro de fluorescência FLUOROMAX (Jobin Yvon, Inc., Edison, NJ); após cada adição de ϵ -ACA, a solução foi deixada a equilibrar até não serem observadas mais alterações na fluorescência.

Os valores da fluorescência resultantes foram corrigidos para a diluição e representados versus a concentração de ϵ -ACA num intervalo de 0-50 μ M de ϵ -ACA. Os resultados foram ajustados por regressão não linear para obter um K_d de cerca de 19 μ M.

Uma propriedade do plasminogénio é a sua capacidade para se ligar à fibrina. De modo a determinar se o (TAL6003)-plasminogénio retém a capacidade para interagir com a fibrina, as suas propriedades de ligação à fibrina foram testadas num ensaio de placa de microtitulação no qual a ligação de (TAL6003)-plasminogénio à fibrina foi

avaliada pela sua subsequente ativação por tPA e resultante lise do coágulo. Para este efeito, foi polimerizado 100 μ L de 5 mg/mL de fibrinogénio com trombina em cada poço de uma placa de microtitulação. Foram adicionadas várias concentrações de (TAL6003)-plasminogénio sobre os coágulos de fibrina e foram incubados durante 1 hora a 37 °C. A placa foi lavada extensivamente com PBS enquanto os coágulos de fibrina estavam ainda intactos e ligados às paredes. Após a lavagem, foi adicionada uma solução de 0,1 mg/mL de tPA a cada poço e a placa foi incubada 2 horas a 37 °C. Como resultado, alguns dos coágulos foram completamente dissolvidos e alguns foram parcialmente dissolvido, enquanto os poços com quantidades muito pequenas de (TAL6003)-plasminogénio e os poços de controlo permaneceram praticamente intactos. O grau de fibrinólise foi monitorizado medindo a absorvência a 280 nm do restante dos coágulos iniciais reconstituídos em NaOH a 1 M. Os valores de absorvência foram representados graficamente como uma função da concentração de (TAL6003)-plasminogénio.

Como apresentado na Figura 8, a ligação do (TAL6003)-plasminogénio à fibrina seguiu uma curva de ligação clássica, sigmoidal. Utilizando este ensaio, descobriu-se que o (TAL6003)-plasminogénio se liga à fibrina com uma afinidade comparável àquela do plasminogénio de comprimento total e à C_{50} desta interação ($\sim 0,3 \mu$ M) é comparável à K_d da ligação à fibrina do plasminogénio de comprimento total.

Estas experiências indicam que o (TAL6003)-

plasminogénio se pode ligar à fibrina. Para além disso, pelo menos a interação do (TAL6003)-plasminogénio com lisina-Sepharose, a sua capacidade para se ligar a ϵ -ACA com a K_d esperada, a sua capacidade para se ligar à fibrina, e a sua capacidade para ser ativada por um ativador de plasminogénio, todos indicaram que esta molécula foi produzida no sistema de *E. coli* numa forma completamente funcional.

Purificação e Formulação de (TAL6003)-plasmina

A adição de SK à solução de (TAL6003)-plasminogénio purificado é responsável pela conversão do (TAL6003)-plasminogénio em (TAL6003)-plasmina. A proteína foi concentrada para 2 mg/mL e diluída 1:1 com glicerol a 50% para produzir uma solução de 1 mg/mL em glicerol a 25%. A solução foi levada até à temperatura ambiente e foi adicionada estreptoquinase a uma proporção molar de 1:100 de SK:(TAL6003)-plasminogénio. A reação foi incubada sem agitação à temperatura ambiente durante 4,5 h. A reação foi então abrandada através da adição de NaCl para uma concentração final de 0,5 M. A análise da ativação por SDS-PAGE indicou um rendimento de 90% da proteína ativada.

A (TAL6003)-plasmina ativada foi purificada por Cromatografia de Afinidade para a Benzamidina. O objetivo da purificação por afinidade da benzamidina foi a separação de (TAL6003)-plasminogénio não activado e impurezas, incluindo produtos da degradação de (TAL6003)-plasmina, a partir da (TAL6003)-plasmina ativa. A solução de ativação

de SK foi aplicada a uma coluna equilibrada de Benzamidina-SEPHAROSE™ 4 Fast Flow. A (TAL6003)-plasmina, tanto a cortada como a intacta, foi capturada através da resina de afinidade enquanto as impurezas acima mencionadas fluíram através da coluna. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio até a absorvência a 280 nm ter alcançado uma linha de base. A ligação da (TAL6003)-plasmina foi então eluída utilizando um passo de ϵ -ACA a pH baixo para remover toda a proteína que permanece na coluna. Os rendimentos típicos foram de 75%, com a proteína que é 95% ativa como medido pelo ensaio da potência de plasmina cromogénica.

Devido à (TAL6003)-plasmina, semelhante à plasmina de comprimento total, ser propensa à auto-degradação a pH fisiológico, pH 3,6 foi escolhida para a formulação final (acidificada com ácido acético-soro fisiológico). Como apresentado previamente para a plasmina por Novokhatny *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 1(5): 1034-41 (2003), incorporado por referência, e confirmado nas experiências com (TAL6003)-plasmina, esta baixa capacidade tamponante, formulação de pH baixo não apenas permite um armazenamento com segurança das plasminas ativas durante períodos de tempo prolongados, mas também é compatível com a administração parentérica destes trombolíticos diretos. Quando misturado com plasma ou tampões a pH neutro, a (TAL6003)-plasmina é rapidamente reativada.

Propriedades Enzimáticas de (TAL6003)-plasmina

A atividade amidolítica da (TAL6003)-plasmina foi

examinada utilizando o substrato de plasmina D-Val-Leu-Lys-pnitroanilida (S-2251) (DiaPharma, West Chester, OH).

Para (TAL6003)-plasmina, a pH 7,4, 25 °C em tampão PBS, a constante de Michaelis-Menten (K_M) para S-2251 foi observada como sendo também 141 μM (Tabela 2). A k_{cat} para a preparação foi observada como sendo cerca de 725 min^{-1} . Utilizando a titulação de cloridrato de 4-nitrofenil 4-guanidinobenzoato (pNPGB) (Chase, T. e E. Shaw, *Methods Enzymol.* 197: 20-27 (1970)), a percentagem de sítios ativos funcionais foi observada como sendo 67%. Corrigindo a k_{cat} para a percentagem de sítios ativos, foi determinada uma k_{cat} de cerca de 725 min^{-1} . Este valor estava muito próximo do valor determinado no mesmo ensaio para a plasmina de comprimento total, $820 \pm 23 \text{ min}^{-1}$ e para micro-plasmina (sem todos os cinco kringles), $795 \pm 24 \text{ min}^{-1}$. Estes resultados indicam que a presença ou ausência de kringles não afeta a atividade catalítica do domínio da protease serínica.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos em estado estacionário para várias espécies de plasmina com substrato S-2251, em tampão PBS, pH 7,4, 25 °C.		
	K_M	k_{cat}
plasmina	$220 \pm 9 \mu\text{M}$	$820 \pm 23 \text{ min}^{-1}$
mini-plasmina	$160 \pm 30 \mu\text{M}$	$770 \pm 70 \text{ min}^{-1}$
micro-plasmina	$145 \pm 13 \mu\text{M}$	$795 \pm 24 \text{ min}^{-1}$
(TAL6003)-plasmina	$141 \pm 9 \mu\text{M}$	725 min^{-1}

A taxa de inibição da (TAL6003)-plasmina por $\alpha 2$ -antiplasmina foi determinada como sendo $1,8 \pm 0,06 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ utilizando o método de Wiman e Collen (Wiman, B. e D. Collen, *Eur. J. Biochem.* 84: 573-578 (1978)) em que a plasmina e $\alpha 2$ -antiplasmina são misturadas depois avaliada para a actividade de S-2251 em pontos de tempo específicos (Tabela 3). Este valor é comparável com os valores relatados para plasmina de $2,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (de Anonick, et al., *Thrombosis Res.* 59: 449 (1990)).

Tabela 3. Taxas de inibição para várias espécies de plasmina e inibidores foram determinadas a 22 °C em tampão PBS, pH 7,4.

	$\alpha 2$ -antiplasmina
plasmina	$2,5 \pm 0,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
mini-plasmina	$2,4 \pm 0,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
micro-plasmina	$1,8 \times 0,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
(TAL6003)-plasmina	$1,8 \pm 0,06 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

As mesmas experiências realizadas com micro-plasmina revelaram taxas de inibição de $\alpha 2$ -antiplasmina de $1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $3,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em duas experiências separadas. A taxa de inibição de $\alpha 2$ -antiplasmina mini-plasmina (composição do domínio de mini-plasmina, K5-SP) foi determinada como sendo $2,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Estes resultados estão em concordância razoável com os valores da literatura para micro- e mini-plasmina e demonstram que a inibição de (TAL6003)-plasmina por $\alpha 2$ -antiplasmina é 40 vezes mais rápida do que a inibição de micro-plasmina ou mini-plasmina. Assim, estes resultados indicam que a

(TAL6003)-plasmina deve ser rapidamente inibida por $\alpha 2$ -antiplasmina devido à presença de kringle 1 na sua estrutura. Globalmente, os resultados apresentados nesta seção demonstram que as propriedades enzimáticas e inibidoras da (TAL6003)-plasmina é semelhante à plasmina de comprimento total.

Os valores da literatura são retirados de Anonick, *et al.*, *Thrombosis Res.* 59: 449 (1990). Todas as taxas foram medidas de acordo com os métodos publicados em Anonick, *et al.*

Eficácia Fibrinolítica *In Vitro*

A eficácia fibrinolítica da (TAL6003)-plasmina foi testada num modelo *in vitro* de ensaio de lise de coágulos utilizando o seguinte protocolo experimental.

A comparação *in vitro* da eficácia trombolítica da (TAL6003)-plasmina com plasma derivado do plasma. Foram misturadas quantidades equimolares de plasmina derivada do plasma (0,25 mg/mL) e (TAL6003)-plasmina (0,11 mg/mL) foram misturados com coágulos do sangue no tubo de ensaio e o grau de lise do coágulo foi monitorizado por A280 absorvência do material liberta do coágulo.

As concentrações da plasmina ou (TAL6003)-plasmina necessárias para ultrapassar os inibidores de plasma na presença de fibrina e iniciar a lise do coágulo são apresentados na Figura 9.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Talecris Biotherapeutics, Inc.
Novokhatny, Valery

<120> Plasmina Modificada de Forma Recombinante

<130> T126 1190.PCT

<150> US 60/991,148

<151> 2007-11-29

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1032

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sequência de nucleótidos que codifica um polipeptido possuindo um domínio kringle N-terminal único homólogo a um domínio kringle de um plasminogénio humano nativo

<400> 1

```

atgcgtgatg tcgtcttatt cgagaagaaa gtctatztat ctgaatgtaa aacaggcaat      60
ggtaaaaaact atcgcggtac catgtccaaa acaaaaaacg gtatcacttg tcaaaaatgg      120
tctagcaactt ccccccatcg tcctcgtttc tccccgcga cccatccctc tgaaggcctc      180
gaagaaaaact actgcgcgaa ccccgataat gatcctcaag gcccatgggtg ttatactacc      240
gatcctgaaa aacgttatga ctattgcgat gtcccacaat gcgcagcccc ttcttttgat      300
tgcggcacaa cacaagttga acccaagaaa tgtccaggtc gtgttgctcg cggttggtgt      360
gcgcatcccc acagttggcc gtggcaggtc tcattacgta ccgggttttg aatgcacttt      420
tgtggcggca ctctcatctc gcccgaaatgg gttcttacag ctgcacactg tttgaaaaaa      480
agcccccgtc cttcttctta taaagttatc ctgggcgcac atcaagaagt caatttagaa      540
cctcatgtac aagaaatcga agtatctcgt ttattcctgg aaccgactcg caaagacatc      600
gcattactta aactgtcttc ccccgctgtg atcaccgata aagtaattcc cgcgtgttta      660
ccttctctta attatgttgt tgcagatcgt acagaatgct ttattaccgg ctggggtgaa      720
actcaaggta cttttgggtg gggactcctg aaagaagcac agttaccagt catcgaaaac      780
aaagtatgta atcgctaaga attcttaaac ggtcgtgttc aatccacaga attgtgcgca      840
ggtcatttag caggtggcac tgatagctgt caaggtgatt caggtggtcc tctcgtatgt      900
ttcgaaaaag ataaatatat tctgcaaggc gtcacctctt ggggttttag ttgtgctcgt      960
ccaataaac ctggtgtata tgtacgtgta agtcgttttg ttacctggat tgaagggtgt      1020

```

atgcggaaca ac

1032

<210> 2

<211> 344

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Polipéptido possuindo um domínio kringle N-terminal único
homólogo a um domínio kringle de um plasminogénio humano nativo

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu
165 170 175

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

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

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

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

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

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

Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr Asp
275 280 285

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

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

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

Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
340

<210> 3

<211> 2430

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggaacata aggaagtggg ttttctactt cttttatttc tgaaatcagg tcaaggagag	60
cctctggatg actatgtgaa taccagggg gtttcaactgt tcagtgtcac taagaagcag	120
ctgggagcag gaagtataga agaattgtga gcaaatgtg aggaggacga agaattcacc	180
tgcagggcat tccaatatca cagtaaagag caacaatgtg tgataatggc tgaaaacagg	240
aagtccctcc taatcattag gatgagagat gtagttttat ttgaaaagaa agtgtatctc	300
tcagagtgca agactgggaa tggaaagaac tacagaggga cgtgtccaa aacaaaaaat	360
ggcatcacct gtcaaaaatg gagttccact tctccccaca gacctagatt ctcacctgct	420

acacacccct	cagagggact	ggaggagAAC	tactgcagga	atccagacaa	cgatccgcag	480
gggccctggt	gctatactac	tgatccagaa	aagagatatg	actactgcga	cattcttgag	540
tgtgaagagg	aatgtatgca	ttgcagtggA	gaaaactatg	acggcaaaat	ttccaagacc	600
atgtctggac	tggaatgcca	ggcctgggac	tctcagagcc	cacacgctca	tggtacatt	660
ccttccaaat	ttccaaacaa	gaacctgaag	aagaattact	gtcgtaaccc	cgatagggag	720
ctgcggcctt	ggtgtttcac	caccgacccc	aacaagcgct	gggaactttg	cgacatcccc	780
cgctgcacaa	cacctccacc	atcttctggt	cccacctacc	agtgtctgaa	gggaacaggt	840
gaaaactatc	gcgggaatgt	ggctgttacc	gtttccgggc	acacctgtca	gcactggagt	900
gcacagaccc	ctcacacaca	taacaggaca	ccagaaaact	tcccttgcaa	aaatttggat	960
gaaaactact	gccgcaatcc	tgacggaaaa	agggcccat	ggtgccatac	aaccaacagc	1020
caagtgcggt	gggagtactg	taagataccg	tcctgtgact	cctccccagt	atccacggaa	1080
caattggctc	ccacagcacc	acctgagcta	acccctgtgg	tccaggactg	ctaccatggt	1140
gatggacaga	gctaccgagg	cacatcctcc	accaccacca	caggaaagaa	gtgtcagttc	1200
tggtcatcta	tgacaccaca	ccggcaccag	aagacccag	aaaactaccc	aaatgctggc	1260
ctgacaatga	actactgcag	gaatccagat	gccgataaag	gcccctgggt	ttttaccaca	1320
gaccccagcg	tcaggtggga	gtactgcaac	ctgaaaaaat	gctcagggaac	agaagcgagt	1380
gttgtagcac	ctccgcctgt	tgtcctgctt	ccagatgtag	agactccttc	cgaagaagac	1440
tgtatgtttg	ggaatgggaa	aggataccga	ggcaagaggg	cgaccactgt	tactgggacg	1500
ccatgccagg	actgggctgc	ccaggagccc	catagacaca	gcattttcac	tccagagaca	1560
aatccacggg	cgggtctgga	aaaaaattac	tgcctgaacc	ctgatggtga	tgtagggtgt	1620
ccctgggtgt	acacgacaaa	tccaagaaaa	ctttacgact	actgtgatgt	ccctcagtgt	1680
gcggcccttt	catttgattg	tgggaagcct	caagtggagc	cgaagaaatg	tcctggaagg	1740
gttgtggggg	ggtgtgtggc	ccaccacacat	tcctggccct	ggcaagtcag	tcttagaaca	1800
aggtttggaa	tgcactttctg	tggaggcacc	ttgatatccc	cagagtgggt	gttgactgct	1860
gcccactgct	tggagaagtc	cccaaggcct	tcctcctaca	aggtcatcct	gggtgcacac	1920
caagaagtga	atctogaacc	gcattgttcag	gaaatagaag	tgtctaggct	gttcttggag	1980
cccacacgaa	aagatattgc	cttgctaaag	ctaagcagtc	ctgccgtcat	cactgacaaa	2040
gtaatcccag	cttgtctgcc	atccccaat	tatgtggctg	ctgaccggac	cgaatgtttc	2100
atcactggct	ggggagaaac	ccaaggtaact	tttgagctg	gcctttctca	ggaagcccag	2160
ctccctgtga	ttgagaataa	agtgtgcaat	cgctatgagt	ttctgaatgg	aagagtccaa	2220
tccaccgaac	tctgtgctgg	gcatttggcc	ggaggcactg	acagttgcca	gggtgacagt	2280

```

ggaggtcctc tggtttgctt cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttcttgg      2340
ggtcttggct gtgcacgccc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgtttc aaggtttggt      2400
acttggattg agggagtgat gagaaataat .                                     2430

```

<210> 4

<211> 810

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro
355 360 365

Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
370 375 380

Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
385 390 395 400

Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr
405 410 415

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

Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 435 440 445
 Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro
 450 455 460
 Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 465 470 475 480
 Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
 485 490 495
 Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 500 505 510
 His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
 515 520 525
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
 530 535 540
 Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
 545 550 555 560
 Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys
 565 570 575
 Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp
 580 585 590
 Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly
 595 600 605
 Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu
 610 615 620
 Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His
 625 630 635 640
 Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg
 645 650 655
 Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser
 660 665 670

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 791

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu Cys Ala Ala
20 25 30

Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe Gln Tyr His
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr Asn
 305 310 315 320

Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp Ser Ser
 325 330 335

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

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

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

Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala
 385 390 395 400

Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro
 405 410 415

Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu
 420 425 430

Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro Pro Pro Val
 435 440 445

Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp Cys Met Phe
 450 455 460

Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr Val Thr Gly
 465 470 475 480

Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His Ser Ile
 485 490 495

Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn Tyr Cys
 500 505 510

Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn
 515 520 525

Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala Pro
 530 535 540

Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly
 545 550 555 560

Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln
565 570 575

Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu
580 585 590

Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser
595 600 605

Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val
610 615 620

Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu
625 630 635 640

Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala
645 650 655

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

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

Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val
690 695 700

Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val
705 710 715 720

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

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

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

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

Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
785 790

<211> 723

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg
500 505 510

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu
645 650 655

Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp
660 665 670

Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln
675 680 685

Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly
690 695 700

Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met

705

710

715

720

Arg Asn Asn

<210> 7

<211> 714

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro
 195 200 205
 His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
 210 215 220
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His
 225 230 235 240
 Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 245 250 255
 Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro
 260 265 270
 Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
 275 280 285
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
 290 295 300
 Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr
 305 310 315 320
 Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp
 325 330 335
 Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 340 345 350
 Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro
 355 360 365
 Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 370 375 380
 Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
 385 390 395 400
 Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 405 410 415
 His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
 420 425 430

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
 435 440 445
 Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
 450 455 460
 Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys
 465 470 475 480
 Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp
 485 490 495
 Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly
 500 505 510
 Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu
 515 520 525
 Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His
 530 535 540
 Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg
 545 550 555 560
 Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser
 565 570 575
 Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser
 580 585 590
 Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp
 595 600 605
 Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln
 610 615 620
 Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn
 625 630 635 640
 Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly
 645 650 655
 Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu
 660 665 670
 Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys

675

680

685

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

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

<210> 8

<211> 713

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys

675

680

685

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

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

<210> 9

<211> 335

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Polipéptido possuindo um domínio kringle N-terminal único
 homólogo a um domínio kringle de um plasminogénio nativo humano

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 334

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Polipéptido possuindo um domínio kringle N-terminal único
homólogo a um domínio kringle de um plasminogénio nativo humano

<400> 10

Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly

1		5		10		15													
Thr	Met	Ser	Lys	Thr	Lys	Asn	Gly	Ile	Thr	Cys	Gln	Lys	Trp	Ser	Ser				
			20					25					30						
Thr	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Arg	Phe	Ser	Pro	Ala	Thr	His	Pro	Ser	Glu				
		35					40					45							
Gly	Leu	Glu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Asp	Pro	Gln	Gly				
	50					55					60								
Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu	Lys	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Asp				
65					70					75					80				
Val	Pro	Gln	Cys	Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Asp	Cys	Gly	Lys	Pro	Gln	Val				
				85					90						95				
Glu	Pro	Lys	Lys	Cys	Pro	Gly	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	His				
			100					105					110						
Pro	His	Ser	Trp	Pro	Trp	Gln	Val	Ser	Leu	Arg	Thr	Arg	Phe	Gly	Met				
		115					120					125							
His	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Ser	Pro	Glu	Trp	Val	Leu	Thr	Ala				
	130					135					140								
Ala	His	Cys	Leu	Glu	Lys	Ser	Pro	Arg	Pro	Ser	Ser	Tyr	Lys	Val	Ile				
145					150					155					160				
Leu	Gly	Ala	His	Gln	Glu	Val	Asn	Leu	Glu	Pro	His	Val	Gln	Glu	Ile				
				165				170						175					
Glu	Val	Ser	Arg	Leu	Phe	Leu	Glu	Pro	Thr	Arg	Lys	Asp	Ile	Ala	Leu				
			180				185						190						
Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Pro	Ala	Val	Ile	Thr	Asp	Lys	Val	Ile	Pro	Ala				
		195					200					205							
Cys	Leu	Pro	Ser	Pro	Asn	Tyr	Val	Val	Ala	Asp	Arg	Thr	Glu	Cys	Phe				
	210					215					220								
Ile	Thr	Gly	Trp	Gly	Glu	Thr	Gln	Gly	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu				
225					230					235					240				
Lys	Glu	Ala	Gln	Leu	Pro	Val	Ile	Glu	Asn	Lys	Val	Cys	Asn	Arg	Tyr				
			245					250						255					

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 79

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Kringel1

<222> (1)..(79)

<400> 11

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

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

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

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

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

<210> 12

<211> 78

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Kringle2

<222> (1)..(78)

<400> 12

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 78

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Kringle3

<222> (1)..(78)

<400> 13

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 78

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Kringle4

<222> (1)..(78)

<400> 14

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

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

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

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

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

<210> 15

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Kringle5

<222> (1)..(80)

<400> 15

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

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

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

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

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

Lisboa, 30 de março de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleótido compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido que é pelo menos 95% idêntico à SEQ ID No. 2, possuindo

- a) um domínio kringle N-terminal único homólogo a um domínio kringle de plasminogénio humano nativo, em que os últimos quatro resíduos de aminoácidos no domínio kringle são V,P,Q, e C; e
- b) um sítio de ativação do domínio C-terminal e domínio da protease serínica homólogo aos domínios correspondentes no plasminogénio humano; em que o polipéptido se liga à lisina imobilizada.

2. Polinucleótido da reivindicação 1, em que o polipéptido codificado é a sequência apresentada na SEQ ID NO: 2.

3. Polinucleótido da reivindicação 1, em que a sequência de nucleótidos do polinucleótido é a sequência apresentada na SEQ ID NO: 1, ou uma sua variante degenerada.

4. Polinucleótido da reivindicação 1, em que o polipéptido apresenta uma afinidade de ligação inferior para fibrinogénio do que a afinidade de ligação ao fibrinogénio de mini-plasmina.

5. Polinucleótido da reivindicação 1, em que o polipéptido apresenta uma afinidade de ligação superior para fibrina parcialmente clivada do que a afinidade de ligação para fibrina parcialmente clivada de mini-plasmina.

6. Polinucleótido da reivindicação 1, em que o polipéptido teve imunogenicidade reduzida em comparação com um polipéptido de referência, em que o polipéptido de referência possui uma sequência de aminoácidos primária idêntica à sequência de aminoácidos primária do polipéptido com a condição de pelo menos os quatro últimos resíduos de aminoácidos do domínio kringle N-terminal único do polipéptido de referência não é V,P,Q, e C.

7. Polipéptido codificado pelo polinucleótido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

8. Polipéptido da reivindicação 7, em que o polipéptido apresenta uma atividade fibrinolítica que é inibida pela $\alpha 2$ -antiplasmina a uma taxa de inibição que é pelo menos cerca de 5 vezes mais rápida do que a inibição da atividade fibrinolítica da miniplasmina pela $\alpha 2$ -antiplasmina.

9. Polipéptido da reivindicação 7, em que o polipéptido possui uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 2, e suas substituições conservadoras.

10. Polipéptido da reivindicação 7, em que o polipéptido possui um resíduo de arginina numa posição relativa análogo ao da posição 85 da sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2.

11. Vetor de expressão compreendendo o polinucleótido da reivindicação 1.

12. Célula cultivada compreendendo o vetor de expressão da reivindicação 11.

13. Método para produzir um ou mais polipéptidos de plasmina recombinante possuindo diferentes terminais N, compreendendo o método:

- a) proporcionar um polipéptido de acordo com a reivindicação 7
- b) contatar o polipéptido proporcionado no passo a) com uma protease em condições suficientes para clivar uma ou mais ligações peptídicas formando desse modo um ou mais polipéptidos de plasmina recombinante possuindo diferentes terminais N.

14. Método da reivindicação 13, em que o polipéptido possui uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2.

15. Método da reivindicação 13, em que proporcionar compreende expressar uma sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 1, ou uma sua variante degenerada, em *E. Coli*.

Lisboa, 30 de março de 2015

FIG 1

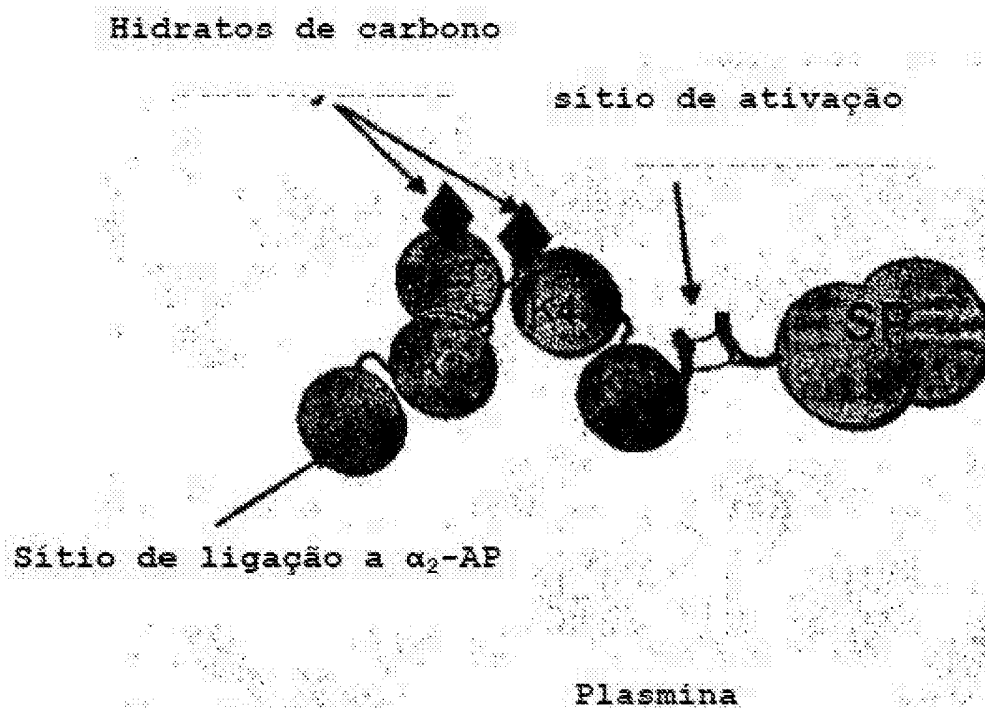
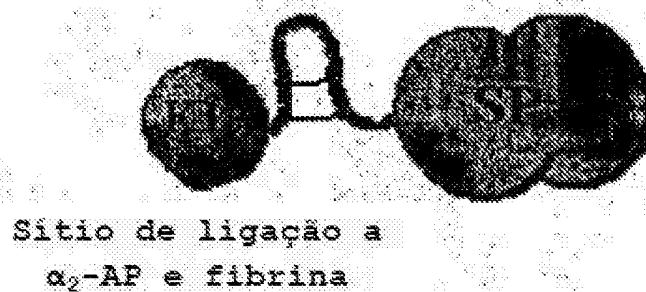


FIG. 2



(TAL6003)- Plasminogénio

FIG. 3

-19 1
MEHREVLILLLLFLKSGQGEFLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEBCAAKCEEDEEFTCRAFO
78
YHSKEQQCVIMAENRKSSIIIP
136 143 153 162
ILECEEECMHCSCGENYDG
kringle 1
234
KISKTMGLECQAWDSQSPHAGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPDRELRPWCFTTDPNKRWELCDIP
kringle 2
RCTTPFPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTCQHWSAQTPHTINRTFENFCKNLDENYCR
kringle 3
324
NPDGKRAPWCHTMTNSQVRWEYCKIPSCDSSPVSTEQLAPTAPPELTFVVQDCYHGDGQSYRGTSS
426
TTTGGKKCQSWSSMTFHRHQKTPENYPNAGLTMNYCRNPDADKGPWCFTTDPVSRWEYCNLKKCS
kringle 4
GTEASVVAPPPVLLPDVETPSEEDCMFGNGKGYRGKRATTVTGTPCQDWAAQEPHRHSIFTPET
kringle 5
532 542 561
NFRAGLEKNYCRNPDGDVGGPWCYTTNFRKLYBYCD
791
(SEQ ID NO:4)

FIG. 4

HK1	<u>CKTGNGKNYR</u>	<u>GTMSKTKNGI</u>	<u>TCQKWSSTSP</u>	<u>HR-PRFSPAT</u>	<u>HPSEGLEENY</u>
HK2	<u>CMHCSGENYD</u>	<u>GKISKTMGL</u>	<u>ECQAWDSQSE</u>	<u>HA-HGYIPSK</u>	<u>FENKNLKKNY</u>
HK3	<u>CLKGTGENYR</u>	<u>GNVAVTVSGH</u>	<u>TCQHWSAQTP</u>	<u>HT-HNRTPEN</u>	<u>FPCKNLDENY</u>
HK4	<u>CYHG DGQSYR</u>	<u>GTSSTTTTGX</u>	<u>KCQSWSSMTP</u>	<u>HR-HQKTPEN</u>	<u>YFNAGLTMNY</u>
HK5	<u>CMFGNGKGYR</u>	<u>GKRATTVTGT</u>	<u>PCQDWAAQEP</u>	<u>HRHSIFTPET</u>	<u>NPRAGLEKNY</u>

(con't)

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

FIG. 5

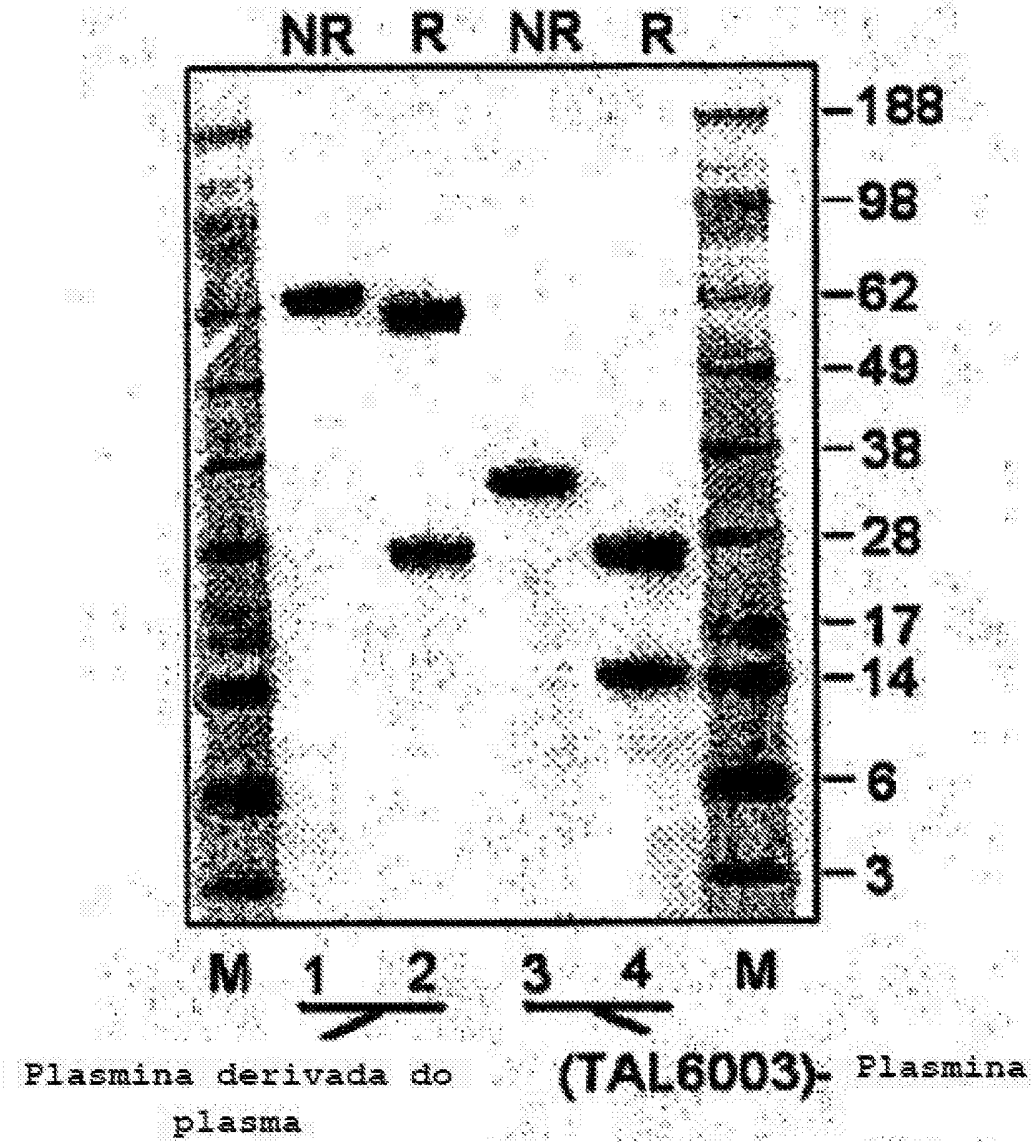


FIG. 6

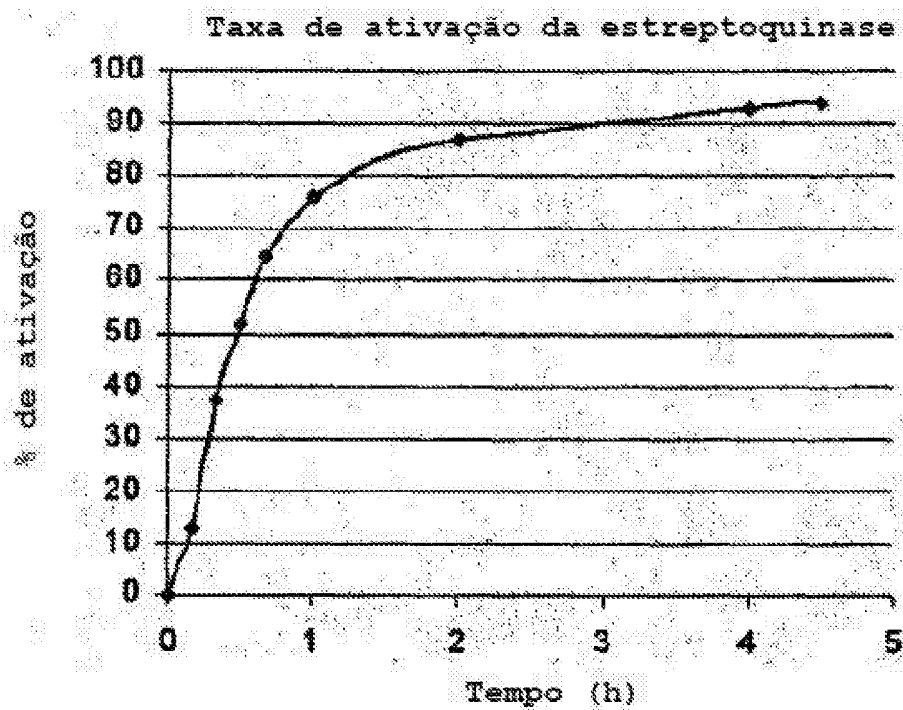


FIG. 7

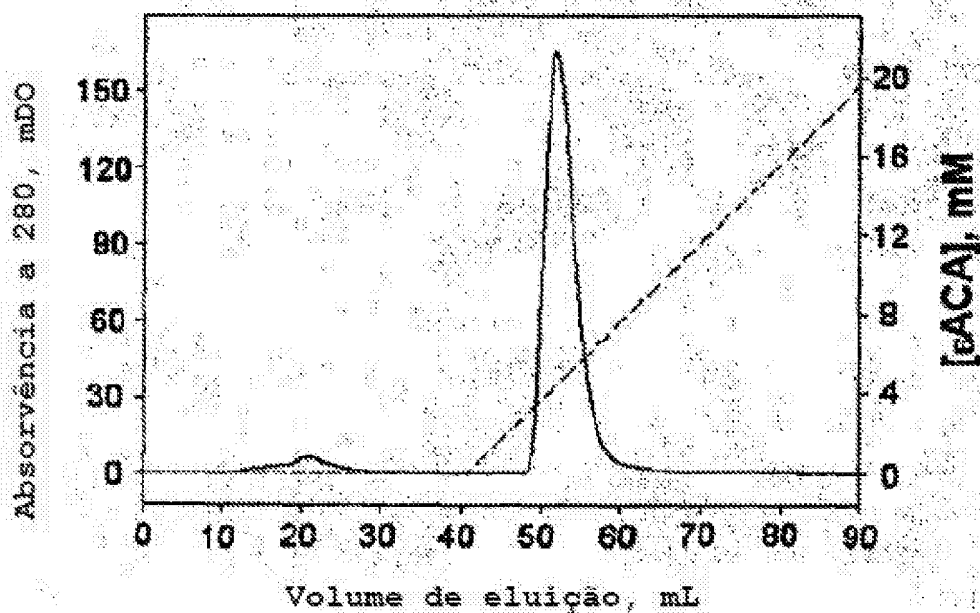


FIG. 8

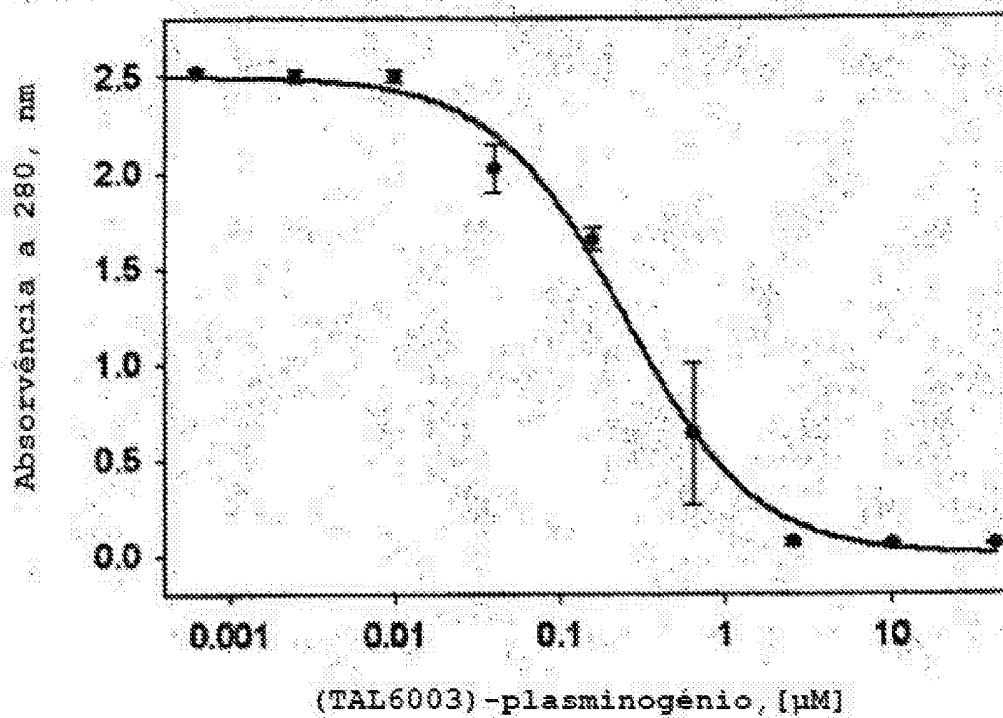


FIG. 9

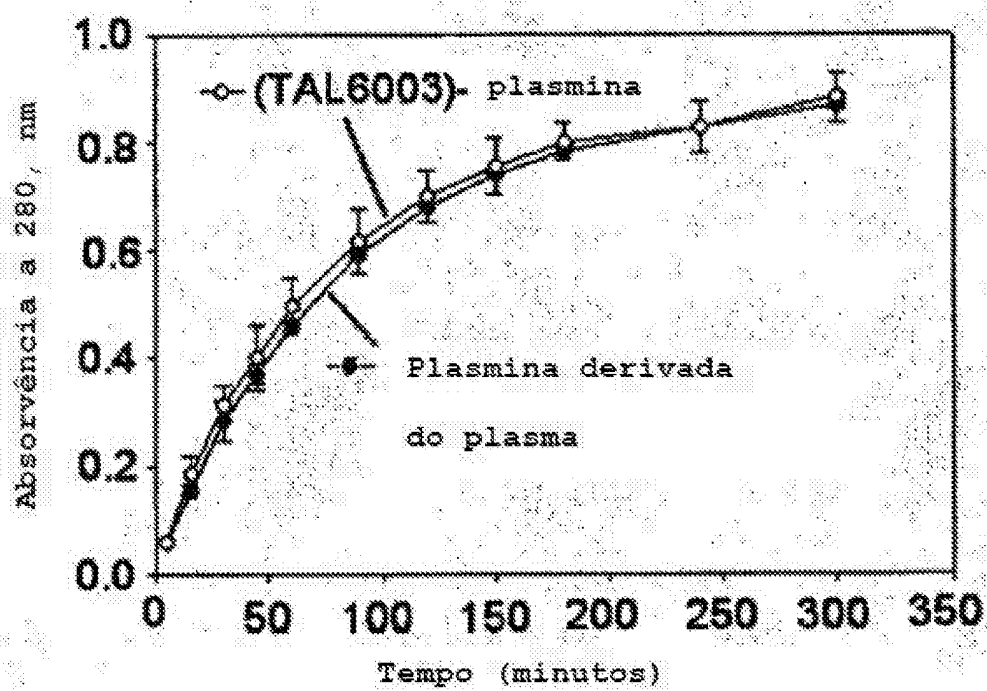
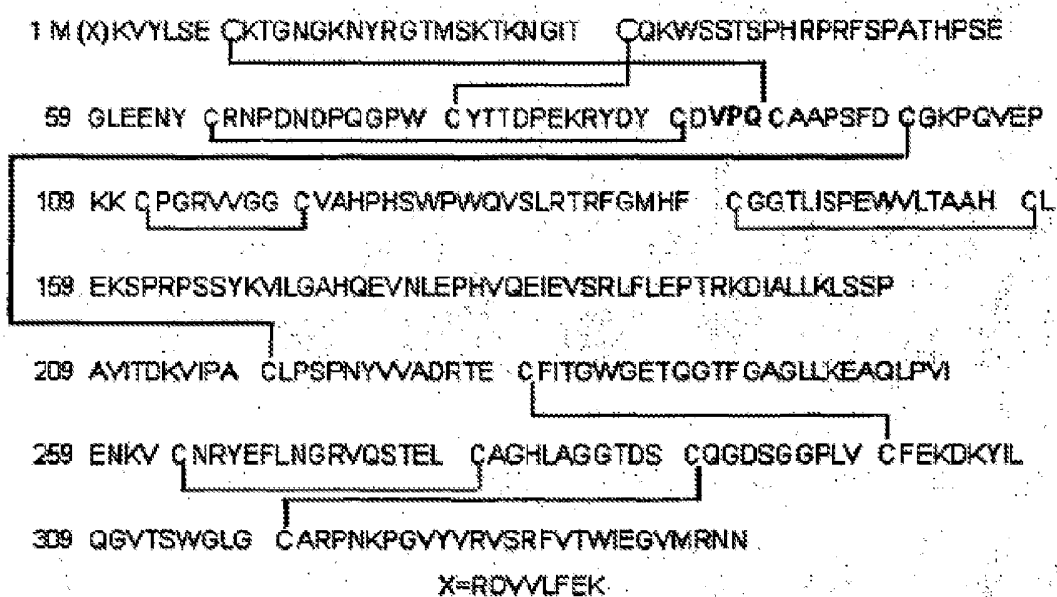


FIGURA 10



(SEQ ID NO:2)

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 2007047874A A
- US 6528103 B, Ji
- US 6218517 B, Suzuki
- EP 0464533 A1
- CA 2045869
- US 4631211 A, Houghten
- US 60991148 B

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- WIMAN, B. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, vol. 579, 142-154
- LUCAS, M.A. et al. *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, 4249-4256
- SOTTRUP-JENSEN, L. et al. *Prog. Chem. Fibrinol. Thrombol.*, 1978, vol. 3, 191-209
- Refolding, purification, and activation of miniplasminogen and microplasminogen isolated from *E. coli* inclusion bodies. MEDYNSKI et al. *Protein Expression and Purification*, Academic Press, 28 October 2006, vol. 52, 395-402
- CHANG, Y. et al. *Biochemistry*, 1998, vol. 37, 3258-3271
- DOUGLAS, J.T. et al. *Biochemistry*, 2002, vol. 41 (10), 3302-10
- ZAJICEK, J. et al. *J. Mol. Biol.*, 2000, vol. 301 (2), 333-47
- LEE, H. et al. *Arch Biochem Biophys*, 2000, vol. 375 (2), 359-63
- CASTELLINO, F.; S. MCCANCE. *Ciba Found Symp.*, 1997, vol. 212, 46-60 [0034]
- MCCANCE, S. et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 32405-32410
- REJANTE, M.R.; M. LLINAS. *Eur. J. Biochem.*, 1994, vol. 221 (3), 939-49
- WU, T.P. et al. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 1994, vol. 5 (2), 157-66
- HOOVER, C.J. et al. *Biochemistry*, 1993, vol. 32(41), 10936-43
- MENHART, N. et al. *Biochemistry*, 1993, vol. 32, 8799-8808
- THEWES, T. et al. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265 (7), 3906-3915
- NOVOKHATNY, V. et al. *Thromb Res.*, 1989, vol. 53 (3), 243-52
- MOTTA, A. et al. *Biochemistry*, 1987, vol. 26 (13), 3827-36
- NOVOKHATNY, V. et al. *J. Mol. Biol.*, 1984, vol. 179, 215-232
- LERCH, P.G. et al. *Eur. J. Biochem.*, 1980, vol. 107 (1), 7-13
- WIMAN, B.; D. COLLEN. *Nature*, 1978, vol. 272, 549-545
- SOTTRUP-JENSEN, L. et al. *Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis*, Raven Press, 1978, vol. 3
- Current Protocols in Molecular Biology, 1997, vol. I, II, III
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- DNA Cloning: A Practical Approach, 1985, vol. I, II
- Oligonucleotide Synthesis, 1981
- Nucleic Acid Hybridization, 1985
- Transcription and Translation, 1984
- R. I. FRESHNEY. *Animal Cell Culture*, 1986
- Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press, 1986 [0050]
- A Practical Guide to Molecular Cloning, PERBAL, Methods in Enzymology, Academic Press, Inc, 1984
- Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, Cold Spring Harbor Laboratory, 1987
- Methods in Enzymology, vol. 154, 155
- DAVIS et al. *Basic Methods in Molecular Biology*, 1995
- BENNETT, D. et al. *J. Molecular Recognition*, 1995, vol. 8, 52-58
- JOHANSON, K. et al. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270 (16), 9459-9471
- HOUGHTEN, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 5131-5135
- MATSUKA et al. *Eur. J. Biochem.*, 1990, vol. 190, 93-97
- DOUGLAS et al. *J. Biochemistry*, 2002, vol. 41, 3302-3310
- NOVOKHATNY et al. *J. Thromb. Haemost.*, 2003, vol. 1 (5), 1034-41
- CHASE, T.; E. SHAW. *Methods Enzymol.*, 1970, vol. 197, 20-27

- WIMAN, B. ; D. COLLEN. *Eur. J. Biochem.*, 1978, vol. 84, 573-578
- ANONICK et al. *Thrombosis Res.*, 1990, vol. 59, 449