(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 372 978**

(51) Int. CI.:
A61K 38/57 (2006.01)
C12N 15/15 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **07023364 .8**
(96) Fecha de presentación: **06.06.2003**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1941867**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2008**

(54) Título: **POLIPÉPTIDO CON DOMINIO DE KUNITZ MODIFICADO.**

(30) Prioridad:
07.06.2002 US 387239 P
28.08.2002 US 407003 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.01.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.01.2012

(73) Titular/es:
Dyax Corp.
300 Technology Square
Cambridge, MA 02139, US

(72) Inventor/es:
Ladner, Robert. C. y
Ley, Arthur, C.

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptido con dominio de Kunitz modificado

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0001] Las proteasas están implicadas en una amplia gama de rutas biológicas. En particular, las serinproteasas como calicreína, plasmina, elastasa, urocinasa activador de plasminógeno, trombina, inhibidor de coagulación asociado a lipoproteína humana y factores de coagulación como factores VIIa, IXa, Xa, XIa, y XIIa han estado implicadas en rutas que afectan al flujo sanguíneo, por ejemplo, isquemia general y focal, invasión tumoral, fibrinólisis, pérdida de sangre perioperatoria e inflamación. Los inhibidores de serinproteasas específicas, por tanto, han recibido atención como dianas farmacológicas potenciales para diversas enfermedades sistémicas.

[0002] Uno de estos inhibidores, la aprotinina (también denominada inhibidor de tripsina pancreática bovina o BPTI), obtenida del pulmón bovino, ha sido aprobado en los Estados Unidos para uso profiláctico para reducir pérdida de sangre perioperatoria y la necesidad de transfusión en pacientes que se someten a derivación cardiopulmonar (DCP), por ejemplo, en el curso de un procedimiento de injerto de derivación de la arteria coronaria. La aprotinina está disponible comercialmente con el nombre comercial de TRASYLOL® (Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut) y fue aprobado anteriormente para su uso para tratar la pancreatitis. La eficacia de la aprotinina está asociada con sus capacidades relativamente inespecíficas para inhibir una variedad de serinproteasas, incluyendo calicreína plasmática y plasmina. Estas proteasas son importantes en una serie de rutas del sistema de activación de contacto (SAC).

[0003] El SAC es activado inicialmente cuando la sangre entera entra en contacto con la superficie de sustratos extraños (por ejemplo, caolín, vidrio, sulfato de dextrano o superficies óseas dañadas). La calicreína, una serinproteasa, es una enzima plasmática que inicia la cascada SAC que conduce a la activación de neutrófilos, plasmina, coagulación y diversas cininas. La calicreína es secretada como un cimógeno (precalicreína) que circula como una molécula inactiva hasta que es activada por un episodio proteolítico temprano en la cascada de activación de contacto. Claramente, la inhibición específica de calicreína sería un enfoque muy atractivo para controlar la pérdida de sangre asociada con DCP y el inicio de respuesta inflamatoria sistémica (RIS) según se encontraría, por ejemplo, durante diversos procedimientos quirúrgicos invasivos.

[0004] A pesar de ser el único compuesto con licencia para prevenir pérdida de sangre perioperatoria en DCP para procedimientos de injerto de derivación de la arteria coronaria (IDAC), la aprotinina no se usa tan extensamente como se esperaría. Existen serias preocupaciones acerca del uso de este polipéptido bovino en pacientes que requieren DCP, y en particular el uso de este compuesto en procedimientos IDAC. La aprotinina no es específica para calicreína, pero interacciona con enzimas adicionales (por ejemplo, plasmina) en múltiples rutas. Así, el mecanismo de acción de aprotinina es altamente especulativo, y la ausencia de una comprensión precisa de lo que resulta afectado durante el tratamiento con aprotinina produce el riesgo de complicaciones durante el tratamiento. Una complicación citada frecuentemente es trombosis no controlada, debida a las acciones de la aprotinina en la ruta fibrinolítica. Existe preocupación no sólo acerca de episodios hiperagudos como trombosis de los vasos mayores en el periodo perioperatorio, sino también sobre la permeabilidad del injerto después del procedimiento IDAC. Además, como una proteína de ocurrencia natural obtenida de pulmón bovino, la administración de aprotinina en seres humanos puede desencadenar reacciones de hipersensibilidad o anafilácticas o anafilactoides graves después de la primera y, más a menudo, después de la administración repetida a los pacientes. Esto es especialmente preocupante en el gran número de pacientes que se someten a procedimientos IDAC repetidos. Además, existe una preocupación pública creciente sobre el uso de material obtenido de fuentes bovinas como vector potencial para la transmisión de encefalopatía espongiforme bovina a los seres humanos.

[0005] Estas preocupaciones dejan claro que sigue existiendo la necesidad de medios y procedimientos más eficaces y más específicos para prevenir o reducir la pérdida de sangre perioperatoria y el inicio de RIS en un paciente sometido a cirugía que da como resultado la activación del SAC, como procedimientos IDAC en pacientes de DCP, o sustitución de cadera.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0006] La presente descripción, que incluye la invención, se basa en el descubrimiento de péptidos que inhiben las serinproteasas. Las serinproteasas como, por ejemplo, la calicreína, están implicadas, por ejemplo, en rutas que conducen a pérdida excesiva de sangre perioperatoria y al inicio de respuesta inflamatoria sistémica. Entre los inhibidores de péptidos de calicreína preferidos se incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos nº 6.333.402 y 6.057.287 para Markland y col. La presente descripción se dirige en parte al uso de los péptidos en procedimientos y composiciones terapéuticos adecuados para su uso en la eliminación o reducción de diversas isquemias, incluyendo, pero sin limitarse a, pérdida de sangre perioperatoria, y el inicio de respuesta inflamatoria

sistémica. La pérdida de sangre perioperatoria procede de procedimientos quirúrgicos invasivos que conducen a la activación por contacto de componentes de complemento y a los sistemas de coagulación/fibrinólisis. Más específicamente, la presente descripción proporciona procedimientos para el uso de inhibidores de calicreína para reducir o prevenir la pérdida de sangre perioperatoria y una respuesta inflamatoria sistémica en pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos invasivos, especialmente cirugías cardiotorácicas.

[0007] En un caso, la presente descripción se dirige a un procedimiento para prevenir o reducir isquemia en un paciente que comprende la administración al paciente de una composición que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos: Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO: 1), en la que Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 o Xaa58 son cada uno individualmente un aminoácido o ausente; Xaa10 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Asp y Glu; Xaa11 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala y Thr; Xaa13 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys y Gln; Xaa15 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn y Gln; Xaa16 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Ala, Gly, Ser, Asp y Asn; Xaa17 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln y Thr; Xaa18 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: His, Leu, Gln y Ala; Xaa19 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Pro, Gln, Leu, Asn y Ile; Xaa21 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Trp, Phe, Tyr, His y Ile; Xaa22 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Tyr y Phe; Xaa23 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Tyr y Phe; Xaa31 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile y Thr; Xaa32 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Glu, Gln, Asp Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly y Val; Xaa34 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly y Leu; Xaa35 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Tyr, Trp y Phe; Xaa39 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Glu, Gly, Ala, Ser y Asp; Xaa40 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Gly y Ala; Xaa43 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Asn y Gly; Xaa45 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Phe y Tyr; y en la que el polipéptido inhibe calicreína.

[0008] En un caso particular, la isquemia es pérdida de sangre perioperatoria debida a un procedimiento quirúrgico realizado en el paciente. El procedimiento quirúrgico puede ser una cirugía cardiotorácica, como, por ejemplo, injerto de derivación cardiopulmonar o derivación de la arteria coronaria.

[0009] En un caso particular, las posiciones de aminoácido individuales de la SEQ ID NO: 1 pueden ser una o más de las siguientes: Xaa10 es Asp, Xaa11 es Asp, Xaa13 es Pro, Xaa15 es Arg, Xaa16 es Ala, Xaa17 es Ala, Xaa18 es His, Xaa19 es Pro, Xaa21 es Trp, Xaa31 es Glu, Xaa32 es Glu, Xaa34 es Ile, Xaa35 es Tyr, Xaa39 es Glu.

[0010] En otro caso, la presente descripción se dirige a un procedimiento para prevenir o reducir el inicio de respuesta inflamatoria sistémica asociado con un procedimiento quirúrgico en un paciente que comprende la administración al paciente de una composición que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos: Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO: 1), en la que Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 o Xaa58 son cada uno individualmente un aminoácido o ausente; Xaa10 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Asp y Glu; Xaa11 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala y Thr; Xaa13 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys y Gln; Xaa15 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn y Gln; Xaa16 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Ala, Gly, Ser, Asp y Asn; Xaa17 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln y Thr; Xaa18 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: His, Leu, Gln y Ala; Xaa19 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Pro, Gln, Leu, Asn y Ile; Xaa21 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Trp, Phe, Tyr, His y Ile; Xaa22 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Tyr y Phe; Xaa23 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Tyr y Phe; Xaa31 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile y Thr; Xaa32 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Glu, Gln, Asp Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly y Val; Xaa34 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly y Leu; Xaa35 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Tyr, Trp y Phe; Xaa39 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Glu, Gly, Ala, Ser y Asp; Xaa40 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Gly y Ala; Xaa43 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Asn y Gly; Xaa45 es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: Phe y Tyr; y en la que el polipéptido inhibe calicreína. En un caso particular, el procedimiento quirúrgico puede ser una cirugía cardiotorácica, como, por

ejemplo, injerto de derivación cardiopulmonar o derivación de la arteria coronaria. En un caso particular, las posiciones de aminoácidos individuales de la SEQ ID NO: 1 pueden ser una o más de las siguientes: Xaa10 es Asp, Xaa11 es Asp, Xaa13 es Pro, Xaa15 es Arg, Xaa16 es Ala, Xaa17 es Ala, Xaa18 es His, Xaa19 es Pro, Xaa21 es Trp, Xaa31 es Glu, Xaa32 es Glu, Xaa34 es Ile, Xaa35 es Tyr, Xaa39 es Glu.

[0011] En otro caso más, la presente descripción se dirige a un procedimiento para prevenir o reducir el inicio de respuesta inflamatoria sistémica asociado con un procedimiento quirúrgico en un paciente que comprende la administración al paciente de una composición que comprende un polipéptido consistente en la secuencia de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 de la SEQ ID NO: 2), en la que el polipéptido inhibe calicreína. En un caso, el procedimiento quirúrgico es una cirugía cardiotorácica, como, por ejemplo, injerto de derivación cardiopulmonar o derivación de la arteria coronaria.

[0012] En otro caso, la presente descripción se dirige a un procedimiento para prevenir o reducir isquemia en un paciente que comprende la administración al paciente de una composición que comprende un polipéptido consistente en la secuencia de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 de la SEQ ID NO: 2), en la que el polipéptido inhibe calicreína. En un caso particular, la isquemia puede ser pérdida de sangre perioperatoria debida a un procedimiento quirúrgico realizado en el paciente. En un caso, el procedimiento quirúrgico es una cirugía cardiotorácica, como, por ejemplo, injerto de derivación cardiopulmonar o derivación de la arteria coronaria.

[0013] En otro caso más, la presente descripción se dirige a un procedimiento para prevenir o reducir el inicio de respuesta inflamatoria sistémica asociada con un procedimiento quirúrgico en un paciente que comprende la administración al paciente de una composición que comprende un polipéptido consistente en la secuencia de aminoácidos: Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 5-60 de la SEQ ID NO: 2), en la que el polipéptido inhibe calicreína. En un caso, el procedimiento quirúrgico es una cirugía cardiotorácica, como, por ejemplo, injerto de derivación cardiopulmonar o derivación de la arteria coronaria.

[0014] En otro caso, la presente descripción se dirige a un procedimiento para prevenir o reducir isquemia en un paciente que comprende la administración al paciente de una composición que comprende un polipéptido consistente en la secuencia de aminoácidos: Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 5-60 de la SEQ ID NO: 2), en la que el polipéptido inhibe calicreína. En un caso particular, la isquemia puede ser pérdida de sangre perioperatoria debida a un procedimiento quirúrgico realizado en el paciente. En un caso, el procedimiento quirúrgico es una cirugía cardiotorácica, como, por ejemplo, injerto de derivación cardiopulmonar o derivación de la arteria coronaria.

[0015] Basándose en la descripción contenida en la presente memoria descriptiva, la presente invención proporciona:

[0016] Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 de la SEQ ID NO: 2), en la que el polipéptido inhibe calicreína plasmática.

[0017] En una forma de realización, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 de la SEQ ID NO: 2).

[0018] En una forma de realización, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos: Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 2).

[0019] La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la invención y uno o más tampones, vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables.

[0020] La presente invención proporciona además un recipiente que comprende una composición farmacéutica de la invención.

[0021] La presente invención proporciona además una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la invención.

[0022] En las reivindicaciones adjuntas se exponen aspectos y formas de realización adicionales de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0023] La fig. 1 es un diagrama simplificado de múltiples rutas importantes y episodios relacionados que intervienen en el sistema de activación de contacto y la respuesta inflamatoria sistémica (RIS) que puede aparecer en un paciente sometido a traumatismo en tejidos óseos y blandos como el asociado con un procedimiento de injerto de derivación de la arteria coronaria (IDAC), especialmente cuando el procedimiento IDAC implica circulación sanguínea extracorpórea, como derivación cardiopulmonar (Aparato de derivación). Las flechas indican la activación desde un componente o episodio a otro componente o episodio en la cascada. Las flechas en ambas direcciones indican efectos de activación de componentes o episodios en ambas direcciones. Las flechas de trazo discontinuo indican la probable participación de un componente o episodio en la activación de otro componente o episodio. Las abreviaturas son las siguientes: "tPA" = activador de plasminógeno de tejido; "C5a" = un componente de proteínas del sistema de complemento; "fXIIa" = proteína de activador de precalicreína para formar calicreína activa; "Extrínseca" = sistema de coagulación extrínseca; "Intrínseca" = sistema de coagulación intrínseca.

[0024] La fig. 2 muestra una parte de un ADN y la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente para un polipéptido de KI de la invención en plásmido pPIC-K503. El ADN insertado codifica el péptido de señal prepro matα de *Saccharomyces cerevisiae* (subrayado) fusionado en el marco con el extremo amino del polipéptido de KI PEP-1 que tiene la secuencia de aminoácidos confinada por la zona en el recuadro. La secuencia de aminoácidos del polipéptido de KI PEP-1 mostrada en la región del recuadro es SEQ ID NO: 2, y la secuencia de codificación de nucleótidos correspondiente del polipéptido de KI es SEQ ID NO: 3. Las flechas en trazo discontinuo indican la localización y la dirección de dos secuencias de cebador de PCR en regiones AOX que se usaron para producir plantillas de secuenciación. La secuencia de ADN para la secuencia de nucleótidos completa de la figura comprende la secuencia de codificación estructural para la proteína de fusión y se designa como SEQ ID NO: 27. La parte con doble subrayado de la secuencia indica una secuencia de sonda de diagnóstico. BstBI y EcoRI indican localizaciones de sus respectivos sitios de endonucleasa de restricción hexamérica palindrómica en la secuencia. Los asteriscos denotan codones de fin de traducción.

[0025] Las fig. 3A y 3B muestran una alineación de secuencias de aminoácidos de casos preferidos de la presente descripción, la secuencia LACI nativa de la cual se obtienen estas variantes (SEQ ID NO: 32) y otros dominios de Kunitz conocidos (SEQ ID NO: 29-31 y 33-53). Se resaltan los residuos de cisteína.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0026] Se ofrece a continuación una descripción de casos preferidos de la presente descripción.

[0027] La presente descripción, incluida la invención, se basa en el descubrimiento de un grupo de polipéptidos de inhibidor de calicreína (KI) que inhiben la calicreína plasmática con una especificidad que permite su uso en procedimientos mejorados para prevenir o reducir isquemia como, por ejemplo, pérdida de sangre perioperatoria y/o una respuesta inflamatoria sistémica (RIS) inducida por calicreína, especialmente, por ejemplo, en pacientes que se someten a procedimientos quirúrgicos y en particular procedimientos quirúrgicos que implican cirugía cardiotorácica, por ejemplo, derivación cardiopulmonar (DCP), como un procedimiento de injerto de derivación de la arteria coronaria (IDAC). Los KI pueden usarse específicamente, por ejemplo, para cirugía cardiaca pediátrica, trasplante de pulmón, sustitución total de cadera y trasplante de hígado ortotópico, y para reducir o prevenir accidente cerebrovascular perioperatorio durante IDAC, oxigenación de membrana extracorpórea (OMEC) y accidentes cerebrovasculares (ACV) durante estos procedimientos.

[0028] La cirugía cardiotorácica es cirugía del área del tórax, con la máxima frecuencia el corazón y los pulmones. Entre las enfermedades típicas tratadas por cirugía cardiotorácica se incluyen enfermedad de la arteria coronaria, tumores y cánceres de pulmón, esófago y pared torácica, anomalías de los vasos y válvulas cardiacos y defectos congénitos que afectan al tórax o al corazón. Cuando se usa cirugía cardiotorácica para tratamiento, se incurre en riesgo de pérdida de sangre (por ejemplo, isquemia inducida por cirugía) y en el inicio de una respuesta inflamatoria sistémica (RIS). La RIS inducida por cirugía puede provocar disfunción orgánica grave (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; SRIS).

Polipéptidos útiles de acuerdo con la presente descripción

[0029] Los polipéptidos de KI útiles de acuerdo con la presente descripción comprenden polipéptidos de

dominio de Kunitz. En un caso estos dominios de Kunitz son formas variantes de la estructura en bucle que comprende dominio de Kunitz 1 de proteína de inhibidor de coagulación asociado a lipoproteína (LACI) humana. El LACI contiene tres estructuras de bucle de péptidos internas bien definidas que son dominios de Kunitz paradigmáticos (Girard, T. y col., 1989. Nature, 338:518-520). Los tres dominios de Kunitz de LACI confieren la capacidad de unirse e inhibir la calicreína, aunque sin afinidad excepcional. Las variantes de dominios de Kunitz 1 de LACI descritas en la presente memoria descriptiva se han cribado, aislado y se unen a calicreína con afinidad y especificidad mejoradas (véanse, por ejemplo, patentes de EE.UU. nº 5.795.865 y 6.057.287). Un ejemplo de un polipéptido preferido útil de acuerdo con la presente descripción, y que es un polipéptido de la invención, tiene la secuencia de aminoácidos definida por los aminoácidos 3-60 de la SEQ ID NO: 2.

[0030] Todos los polipéptidos útiles de acuerdo con la presente descripción se unen a calicreína, y son también polipéptidos preferidos los inhibidores de calicreína (KI) según se determinan usando ensayos de unión e inhibición de calicreína conocidos en la técnica. La afinidad y especificidad mejorada para calicreína de los polipéptidos del dominio de Kunitz variante descrito en la presente memoria descriptiva proporciona la base para su uso en cirugía cardiotorácica, por ejemplo, DCP y especialmente procedimientos quirúrgicos IDAC, para prevenir o reducir la pérdida de sangre perioperatoria y/o el inicio de RIS en pacientes que se someten a dichos procedimientos. Los polipéptidos de KI usados de acuerdo con la presente descripción tienen o comprenden la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de dominio de Kunitz variante aislado originalmente mediante cribado de bibliotecas de expresión en fagos para la capacidad de unirse a calicreína.

[0031] Los polipéptidos de KI útiles en los procedimientos y las composiciones de la presente descripción comprenden un polipéptido de dominio de Kunitz que comprende la secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys
Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26
Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39
Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys
Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO:1)

[0032] "Xaa" se refiere a una posición en una cadena de péptidos que puede ser cualquiera entre una serie de diferentes aminoácidos. Por ejemplo, para los péptidos KI descritos en la presente memoria descriptiva, Xaa10 puede ser Asp o Glu; Xaa11 puede ser Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala o Thr; Xaa13 puede ser Pro, Arg, His, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys o Gln; Xaa15 puede ser Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn o Gln; Xaa16 puede ser Ala, Gly, Ser, Asp o Asn; Xaa17 puede ser Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln o Thr; Xaa18 puede ser His, Leu, Gln o Ala; Xaa19 puede ser Pro, Gln, Leu, Asn o Ile; Xaa21 puede ser Trp, Phe, Tyr, His o Ile; Xaa31 puede ser Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile o Thr; Xaa32 puede ser Glu, Gln, Asp Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly o Val; Xaa34 puede ser Ile, Thr, Ser, Val, Ala, Asn, Gly o Leu; Xaa35 puede ser Tyr, Tip o Phe; Xaa39 puede ser Glu, Gly, Ala, Ser o Asp. Los aminoácidos Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 y Xaa54 pueden ser cualquier aminoácido. Adicionalmente, cada uno de los primeros cuatro y los últimos tres aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 puede estar presente o ausente opcionalmente y puede ser cualquier aminoácido, si estuviera presente.

[0033] Los péptidos definidos según SEQ ID NO: 1 forman un conjunto de polipéptidos que se unen a calicreína. Por ejemplo, en un caso preferido de la presente descripción, un polipéptido de KI útil en los procedimientos y composiciones de la presente descripción tiene las siguientes posiciones variables: Xaa11 puede ser Asp, Gly, Ser o Val; Xaa13 puede ser Pro, Arg, His o Asn; Xaa15 puede ser Arg o Lys; Xaa16 puede ser Ala o Gly; Xaa17 puede ser Ala, Asn, Ser o Ile; Xaa18 puede ser His, Leu o Gln; Xaa19 puede ser Pro, Gln o Leu; Xaa21 puede ser Trp o Phe; Xaa31 es Glu; Xaa32 puede ser Glu o Gln; Xaa34 puede ser Ile, Thr o Ser; Xaa35 es Tyr; y Xaa39 puede ser Glu, Gly o Ala.

[0034] Un caso más específico de la presente descripción se define mediante los siguientes aminoácidos en posiciones variables: Xaa10 es Asp; Xaa11 es Asp; Xaa13 puede ser Pro o Arg; Xaa15 es Arg; Xaa16 puede ser Ala o Gly; Xaa17 es Ala; Xaa18 es His; Xaa19 es Pro; Xaa21 es Trp; Xaa31 es Glu; Xaa32 es Glu; Xaa34 puede ser Ile o Ser; Xaa35 es Tyr; y Xaa39 es Gly.

[0035] También están comprendidos dentro del ámbito de la presente descripción los péptidos que comprenden partes de los polipéptidos descritos en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, los polipéptidos podrían comprender dominios de unión para epítopos de calicreína específicos. Dichos fragmentos de los polipéptidos descritos en la presente memoria descriptiva también estarían comprendidos.

[0036] Los polipéptidos de KI útiles en los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva comprenden un dominio de Kunitz. A continuación se describe un subconjunto de las secuencias comprendidas por SEQ ID NO: 1 (en el que si no se indica, "Xaa" se refiere al mismo conjunto de aminoácidos que se permiten para SEQ ID NO: 1):

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Arg Xaa21 Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:33).

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (amino acids 3-60 of SEQ ID NO:2),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Asn His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:4),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:5),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Gln Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:6),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Ser Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:7),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:8),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:9),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Lys Gly Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:10),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:11),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:12),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:13),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala Gln Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:14),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Leu Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:15),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Gly Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Gln Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:16),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Gly Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:17),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Arg Gly Ala Leu Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:18),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Asn Cys Arg Gly Asn Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:19),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Arg Cys Arg Gly Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:20),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Ala Ile Gln Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:21),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO:22).

Las fig. 3A y 3B proporcionan una alineación de secuencias de aminoácidos de estas secuencias, la secuencia LACI nativa de la que proceden estas variantes (SEQ ID NO: 32), y otros dominios de Kunitz conocidos (SEQ ID NO: 29-31 y 33-53).

[0037] Los polipéptidos de KI útiles en los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva, incluyendo los polipéptidos de KI de la presente invención, pueden prepararse sintéticamente usando cualquier protocolo y equipo estándar de síntesis de polipéptidos. Por ejemplo, la síntesis paso a paso de un polipéptido de KI descrito en la presente memoria descriptiva puede efectuarse mediante la eliminación de un grupo protector de terminal amino (N) a partir de un aminoácido inicial (es decir, terminal carboxi), y el acoplamiento al mismo del extremo carboxilo del siguiente aminoácido en la secuencia del polipéptido. Este aminoácido está también adecuadamente protegido. El grupo carboxilo del aminoácido de entrada puede activarse para reaccionar con el extremo N del aminoácido ligado mediante formación en un grupo reactivo como, por ejemplo, formación en una carbodiimida, un anhídrido ácido simétrico, o un grupo "éster activo" como ésteres de hidroxibenzotriazol o pentafluorofenilo. Entre los procedimientos preferidos de síntesis de péptidos en fase sólida se incluye el procedimiento BOC, que usa terc-butiloxicarbonilo como grupo protector α-amino, y el procedimiento FMOC, que usa 9-fluorenilmetloxicarbonilo para proteger el α-amino de los residuos de aminoácidos. Los dos procedimientos son bien conocidos para los expertos en la materia (Stewart, J. y Young, J., Solid-Phase Peptide Synthesis (W. H. Freeman Co., San Francisco 1989); Merrifield, J., 1963. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154; Bodanszky, M. y Bodanszky, A., The Practice of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, Nueva York 1984)). Si se desea, pueden designarse aminoácidos de terminal amino- y/o carboxi adicionales en la secuencia de aminoácidos y añadirse durante la síntesis de polipéptidos.

[0038] Alternativamente, los polipéptidos de dominio de Kunitz y los polipéptidos de KI útiles en las composiciones y procedimientos de la presente descripción, incluyendo los polipéptidos de la presente invención, pueden producirse mediante procedimientos recombinantes usando cualquiera entre una serie de células y vectores de expresión correspondientes, incluyendo pero sin limitarse a, vectores de expresión bacterianos, vectores de expresión de levaduras, vectores de expresión de baculovirus, vectores de expresión víricos de mamíferos, y similares. Los polipéptidos de dominio de Kunitz y los polipéptidos de KI útiles en las composiciones y procedimientos de la presente descripción, incluyendo los polipéptidos de la presente invención, pueden producirse también transgénicamente usando moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de codificación para un polipéptido de dominio de Kunitz o de Ki descrito en la presente memoria descriptiva, en la que la molécula de ácidos nucleicos puede estar integrada en y expresarse a partir del genoma de un animal hospedador usando procedimientos transgénicos disponibles en la técnica. En algunos casos, podría ser necesario o ventajoso fusionar la secuencia de codificación para un polipéptido de dominio de Kunitz o un polipéptido de KI que comprenda el dominio de Kunitz con otra secuencia de codificación en un vector de expresión para formar un polipéptido de fusión que se exprese fácilmente en una célula hospedadora. Preferentemente, la célula hospedadora que expresa dicho polipéptido de fusión procesa también el polipéptido de fusión para producir un polipéptido de dominio de Kunitz o de Ki útil de acuerdo con la presente descripción, por ejemplo un polipéptido de la presente invención, que contenga sólo la secuencia de aminoácidos deseada. Obviamente, si cualquier otro u otros aminoácidos permanecen unidos al polipéptido de dominio de Kunitz o de Ki expresado, dicho o dichos aminoácidos adicionales no deberían reducir la unión a calicreína y/o la actividad inhibidora de calicreína del polipéptido de dominio de Kunitz o de Ki se manera que se evite el uso del polipéptido en los procedimientos o las composiciones de la presente descripción.

[0039] Un sistema de expresión recombinante preferido para producir polipéptidos de KI útiles en los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva es un vector de expresión de levadura, que permite una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos para que un polipéptido de KI o polipéptido de dominio de Kunitz se una en el mismo marco de lectura con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de péptidos guía prepro matα de *Saccharomyces cerevisiae*, que a su vez está bajo el control de un promotor de levadura operativo. El plásmido de expresión de levadura recombinante resultante puede transformarse a continuación mediante procedimientos estándar en las células de un hospedador de levadura compatible apropiado, de manera que esas células son capaces de expresar la proteína recombinante a partir del vector de expresión de levadura recombinante. Preferentemente, una célula de levadura hospedadora transformada con dicho vector de expresión recombinante es capaz también de procesar la proteína de fusión para proporcionar un polipéptido de KI activo útil en los procedimientos y composiciones de la presente descripción, por

ejemplo un polipéptido de KI de la presente invención. Un hospedador de levadura preferido para producir polipéptidos de dominio de Kunitz recombinantes y polipéptidos de KI que comprenden dichos dominios de Kunitz es *Pichia pastoris*.

[0040] Según se observa anteriormente, los polipéptidos de KI que son útiles en los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva pueden comprender un polipéptido de dominio de Kunitz descrito en la presente memoria descriptiva. Algunos polipéptidos de KI pueden comprender una secuencia flanqueadora adicional, preferentemente de uno a seis aminoácidos de longitud, en el extremo terminal amino y/o carboxi, siempre que dichos aminoácidos adicionales no reduzcan significativamente la afinidad de unión a calicreína o la actividad de inhibición de calicreína de manera que se impida su uso en los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva. Dichos aminoácidos adicionales pueden añadirse deliberadamente para expresar un polipéptido de KI en una célula hospedadora recombinante en particular o pueden añadirse para proporcionar una función adicional, por ejemplo, para proporcionar un péptido que una el polipéptido de KI a otra molécula o para proporcionar una fracción de afinidad que facilite la purificación del polipéptido. Preferentemente, el o los aminoácidos adicionales no incluyen cisteína, que podría interferir con los enlaces de disulfuro del dominio de Kunitz.

[0041] Un ejemplo de un polipéptido de dominio de Kunitz preferido útil en los procedimientos y composiciones de la presente descripción, y que es un polipéptido de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos de residuos 3-60 de la SEQ ID NO: 2. Cuando se expresa y se procesa en un sistema de expresión de proteínas de fusión de levadura (por ejemplo, basándose en el plásmido de expresión de integración pHIL-D2), como un polipéptido de dominio de Kunitz conserva un dipéptido Glu-Ala de terminal amino adicional a partir de la fusión con la secuencia de péptido guía prepro matα de *S. cerevisiae*. Cuando se secreta a partir de la célula hospedadora de levadura, la mayoría del péptido guía se procesa a partir de la proteína de fusión para producir un polipéptido de KI funcional (referido en la presente memoria descriptiva como "PEP-1") que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 (véase región en recuadro en la fig. 2).

[0042] En particular los polipéptidos de KI preferidos útiles en los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva tienen una afinidad de unión por la calicreína que es del orden de 1.000 veces superior a la de la aprotinina, cuyo uso está aprobado actualmente en procedimientos IDAC para reducir la pérdida de sangre. Las afinidades de unión sorprendentemente altas de dichos polipéptidos de KI descritos en la presente memoria descriptiva indican que dichos polipéptidos de KI muestran un alto grado de especificidad para calicreína para la exclusión de otras dianas moleculares (véase Tabla 1, más adelante). Así, el uso de dichos polipéptidos según la presente descripción reduce buena parte de la especulación acerca de las posibles dianas terapéuticas en un paciente. El menor grado de especificidad mostrado, por ejemplo, por la aprotinina, conduce a posibles efectos secundarios pleiotrópicos y ambigüedad en cuanto a su mecanismo terapéutico.

[0043] Los polipéptidos definidos, por ejemplo, por la SEQ ID NO: 1 contienen posiciones invariantes, por ejemplo, posiciones 5, 14, 30, 51 y 55 sólo pueden ser Cys. Otras posiciones como, por ejemplo, las posiciones 6, 7, 8, 9, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53 y 54 pueden ser cualquier aminoácido (incluyendo los aminoácidos de ocurrencia no natural). En un caso preferido en particular, uno o más aminoácidos corresponden a los de una secuencia nativa (por ejemplo, SEQ ID NO: 32, véase fig. 3). En un caso preferido, al menos una posición variable es diferente a la de la secuencia nativa. En otro caso preferido más, los aminoácidos pueden estar cada uno individualmente o colectivamente sustituidos por una sustitución de aminoácidos conservadora o no conservadora. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras sustituyen un aminoácido por otro aminoácido de estructura química similar y pueden no tener efecto en la función de proteína. Las sustituciones de aminoácidos no conservadoras sustituyen un aminoácido por otro aminoácido de estructura química diferente. Entre los ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservadoras se incluyen, por ejemplo, Asn → Asp, Arg → Lys y Ser → Thr. En un caso preferido, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y/o 21 de estos aminoácidos pueden seleccionarse de forma independiente o colectiva, en cualquier combinación, para la posición correspondiente de la SEQ ID NO: 2.

[0044] Otras posiciones, por ejemplo, las posiciones 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 y 45, pueden ser cualesquiera entre un conjunto seleccionado de aminoácidos. Así SEQ ID NO: 1 define un conjunto de secuencias posibles. Cada miembro de este conjunto contiene, por ejemplo, una cisteína en las posiciones 5, 14, 30, 51 y 55, y cualquiera de un conjunto específico de aminoácidos en las posiciones 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 y 45. En un caso preferido, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y/o 19 de estos aminoácidos pueden seleccionarse de forma independiente o colectiva, en cualquier combinación, para corresponderse con la posición correspondiente de la SEQ ID NO: 2. El péptido tiene preferentemente al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

Procedimientos y composiciones

[0045] La presente descripción se dirige también a procedimientos para prevenir o reducir la isquemia. Se prefieren los procedimientos para prevenir o reducir la pérdida de sangre perioperatoria y/o una respuesta inflamatoria sistémica (RIS) en un paciente, asociados especialmente con cirugía cardiotorácica. Un procedimiento de tratamiento contempla la administración de un polipéptido de KI que comprende un dominio de Kunitz. Un caso del procedimiento contempla el uso de un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que tiene una afinidad por la calicreína que es aproximadamente 1.000 veces o más superior a la de una serinproteasa de amplio espectro como, por ejemplo, aprotinina, que se aísla a partir de pulmón bovino y cuyo uso está aprobado actualmente en procedimientos IDAC (TRASYLOL®, Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut).

[0046] Los pacientes sometidos a cualquiera entre una serie de procedimientos quirúrgicos, especialmente los que afectan a la circulación extracorpórea, por ejemplo, la cirugía cardiotorácica, como, por ejemplo, DCP, y/o traumatismos óseos, como hendidura esternal o sustitución de cadera, están en riesgo de pérdida de sangre perioperatoria e inflamación. El contacto de la sangre de un paciente con las superficies cortantes del hueso o del equipo de DCP es suficiente para activar una o varias respuestas en cascada no deseables, incluyendo un sistema de activación de contacto (SAC), que puede conducir a una pérdida extensa de sangre perioperatoria que requiere una transfusión sanguínea inmediata, así como una respuesta inflamatoria sistémica (RIS), que, a su vez, puede producir daño permanente en los tejidos y órganos. Aunque no se desea estar limitado por ningún mecanismo o teoría en particular, parece que la pérdida de sangre que se produce asociada a cirugía cardiotorácica como, por ejemplo, DCP, como en un procedimiento IDAC, procede probablemente de una fuga extensa en los capilares, que puede derivar en una pérdida importante de sangre que debe reponerse mediante una transfusión sanguínea inmediata.

[0047] Los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva son útiles para prevenir o reducir diversas isquemias incluyendo, por ejemplo, pérdida de sangre perioperatoria y RIS en un paciente sometido a un procedimiento quirúrgico, y especialmente en la que el procedimiento quirúrgico requiere circulación extracorpórea como, por ejemplo, cirugía cardiotorácica, por ejemplo, DCP. Los procedimientos de la presente descripción son útiles en particular para prevenir o reducir la pérdida de sangre perioperatoria y/o RIS en un paciente sometido a un procedimiento IDAC que requiere DCP u otra cirugía cardíaca.

[0048] Las composiciones preferidas para uso médico comprenden un polipéptido de KI descrito en la presente memoria descriptiva. Dichas composiciones útiles pueden comprender además uno o más tampones, vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables, que pueden proporcionar una característica deseable para la composición incluyendo, pero sin limitarse a, mejora en la administración de la composición a un paciente, mejora en la semivida en circulación del polipéptido de KI de la composición, mejora en la compatibilidad de la composición con la química de la sangre del paciente, mejora en el almacenamiento de la composición y/o mejora en la eficacia de la composición tras la administración a un paciente. Además de un polipéptido de KI descrito en la presente memoria descriptiva, las composiciones pueden comprender además uno o más compuestos farmacéuticamente activos adicionales que proporcionan un beneficio profiláctico o terapéutico adicional a un paciente de un procedimiento quirúrgico invasivo.

[0049] Las composiciones útiles en los procedimientos de la presente descripción comprenden cualquiera entre los polipéptidos de dominio de Kunitz o los polipéptidos de KI que comprenden dichos polipéptidos de dominio de Kunitz descritos en la presente memoria descriptiva. En particular se prefieren polipéptidos de KI que comprenden un polipéptido de dominio de Kunitz que tiene una secuencia de 58 aminoácidos de los aminoácidos 3-60 de la SEQ ID NO: 2. Un ejemplo de dicho polipéptido de KI preferido en particular útil en los procedimientos y composiciones de la presente descripción, y que es un polipéptido de KI de la presente invención, es el polipéptido de KI PEP-1 que tiene la secuencia de 60 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en la SEQ ID NO: 3 (véanse, por ejemplo, los nucleótidos 309-488 en la fig. 2). Se entiende que basándose en el código genético conocido, la presente descripción, incluyendo la presente invención, también proporciona formas degeneradas de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 simplemente sustituyendo uno o más de los codones degenerados conocidos para cada aminoácido codificado por la secuencia de nucleótidos. Los nucleótidos 7-180 de la SEQ ID NO: 3, y las formas degeneradas de los mismos, codifican el polipéptido de dominio de Kunitz de ocurrencia no natural que tiene la secuencia de 58 aminoácidos de los aminoácidos 3-60 de la SEQ ID NO: 2.

[0050] Cualquiera entre una diversidad de moléculas de ácidos nucleicos puede comprender la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 7-180 de la SEQ ID NO: 3, formas degeneradas, y partes de las mismas, incluyendo pero sin limitarse a, genomas de fagos recombinantes, vectores víricos de mamíferos recombinantes, vectores víricos de insectos recombinantes, minicromosomas de levaduras y diversos plásmidos. Dichos plásmidos incluyen los usados para clonar y/o expresar dichas secuencias de codificación de nucleótidos. Los vectores de expresión

proporcionan un promotor, que puede estar unido operativamente a una secuencia de nucleótidos en particular y una célula hospedadora apropiada, que es capaz de transcribir la secuencia de codificación de nucleótidos en particular en un ARN mensajero (ARNm) funcional y también traducir el ARNm en el polipéptido correspondiente. A continuación, un polipéptido así producido puede aislarse a partir de la célula hospedadora. Las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de dominio de Kunitz o de Ki descrito en la presente memoria descriptiva pueden prepararse mediante procedimientos estándar de síntesis de ácidos nucleicos, metodología de ADN recombinante, procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y cualquier combinación de los mismos.

Pérdida de sangre perioperatoria y flujo sanguíneo cardiaco reducido

[0051] Debido a los numerosos avances en medicina, cada día se lleva a cabo una serie de procedimientos quirúrgicos altamente invasivos que producen pérdida de sangre, o sitúan a los pacientes en un riesgo alto de pérdida de sangre. Dichos pacientes deben ser vigilados cuidadosamente para restaurar y mantener el riego sanguíneo normal y la hemostasia, y pueden necesitar transfusiones sanguíneas. Entre los procedimientos quirúrgicos que implican pérdida de sangre se incluyen aquellos que implican procedimientos de circulación extracorpórea como cirugía cardiotorácica, por ejemplo, DCP. En dichos procedimientos, se detiene el corazón del paciente y la circulación, la oxigenación y el mantenimiento del volumen sanguíneo se realizan artificialmente usando un circuito extracorpóreo y un oxigenador de membrana sintético. Estas técnicas se usan habitualmente durante la cirugía cardiaca. Adicionalmente, aparentemente la cirugía que implica un traumatismo extenso en el hueso, como la hendidura esternal necesaria en procedimientos IDAC o de sustitución de cadera, se asocia también con activación del SAC, que puede producir una diversidad de perturbaciones en la sangre y la vasculatura.

[0052] La enfermedad de la arteria coronaria (EAC) ateroesclerótica provoca un estrechamiento de la luz de una o varias arterias coronarias; esto limita el flujo de sangre al miocardio (es decir, el músculo cardiaco) y puede provocar angina, insuficiencia cardiaca e infartos de miocardio. En la fase final de la ateroesclerosis de la arteria coronaria, la circulación coronaria puede estar ocluida casi completamente, lo que provoca una angina o una insuficiencia cardiaca potencialmente letal, con una mortalidad muy elevada. Pueden requerirse procedimientos IDAC para puentear el vaso sanguíneo ocluido y restaurar la sangre en el corazón, que son procedimientos con potencial para salvar vidas. Los procedimientos IDAC se encuentran entre las intervenciones quirúrgicas más invasivas, en los que se implantan una o más venas o arterias sanas para proporcionar una "derivación" alrededor del área ocluida del vaso enfermo. Los procedimientos IDAC conllevan un riesgo perioperatorio pequeño pero importante, pero tienen mucho éxito para proporcionar a los pacientes un alivio inmediato de la mortalidad y la morbilidad de la enfermedad cardiovascular ateroesclerótica. A pesar de estos resultados muy alentadores, con frecuencia es necesario repetir los procedimientos IDAC, según se indica ante el claro aumento en el número de pacientes que terminan por someterse a segundos e incluso terceros procedimientos; la mortalidad y la morbilidad perioperatorias observadas en procedimientos IDAC primarios aumentan en estos procedimientos repetidos.

[0053] Se han producido mejoras en las técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas para EAC sin complicaciones. Sin embargo, casi todos los procedimientos IDAC realizados para enfermedad cardiaca valvular y/o congénita, trasplante de corazón e intervenciones aórticas importantes se siguen realizando en pacientes con apoyo para DCP. En DCP, se insertan grandes cánulas en los grandes vasos de un paciente para permitir bombeo y oxigenación mecánicos de la sangre usando un oxigenador de membrana. La sangre se devuelve al paciente sin circular a través de los pulmones, que son hipoperfundidos durante este procedimiento. El corazón se para usando una solución cardiopléjica, se enfría al paciente para ayudar a prevenir lesiones cerebrales y se aumenta el volumen circulante periférico mediante un circuito extracorpóreo, es decir, el circuito DCP, que requiere el "cebado" con sangre de donante y se usan mezclas salinas para llenar el circuito extracorpóreo. La DCP se ha usado extensamente en una diversidad de procedimientos realizados durante casi medio siglo con resultados exitosos. La interacción entre superficies artificiales, células sanguíneas, proteínas de la sangre, entodelio vascular dañado y tejidos extravasculares, como el hueso, perturba la hemostasia y frecuentemente activa el SAC, lo que, según se observa anteriormente, puede producir una diversidad de perturbaciones en la sangre y la vasculatura. Dicha perturbación conduce a un sangrado perioperatorio excesivo, que a continuación requiere una transfusión sanguínea inmediata. A consecuencia de la sangre entera circulante a través de un circuito extracorpóreo en DCP puede incluir también la respuesta inflamatoria sistémica (RIS), que se inicia por activación por contacto de los sistemas de coagulación y de complemento. De hecho, buena parte de la morbilidad y la mortalidad asociadas con procedimientos quirúrgicos de DCP que parecen ser mecánicamente exitosos es la consecuencia de los efectos de la activación de los sistemas de coagulación, fibrinólisis o complemento. Dicha activación puede dañar el sistema pulmonar, para producir síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS), deterioro de la circulación renal y esplácnica, e inducción de una coagulopatía general que conduce a pérdida de sangre y a la necesidad de transfusiones. Además de los peligros de pérdida de sangre perioperatoria, las patologías adicionales asociadas con RIS incluyen déficit neurocognitivos, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, infarto de miocardio agudo, y daño en el tejido cardiaco.

[0054] Las transfusiones sanguíneas también presentan un riesgo importante de infección y elevan el coste de IDAC u otros procedimientos similares que requieren DCP. En ausencia de intervención farmacológica, normalmente deben utilizarse de tres a siete unidades de sangre en un paciente, incluso con técnicas quirúrgicas excelentes. En consecuencia, existe un incentivo considerable para el desarrollo de compuestos farmacológicamente eficaces nuevos y mejorados para reducir o prevenir el sangrado y el RIS perioperatorio en pacientes sometidos a procedimientos DCP e IDAC.

Consideraciones de administración y dosificación para polipéptidos de KI

[0055] Los polipéptidos de KI descritos en la presente memoria descriptiva pueden administrarse a un paciente antes, durante y/o después de un procedimiento quirúrgico en una composición farmacéuticamente aceptable. El término composición "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o excipiente no tóxico que puede administrarse a un paciente, junto con un compuesto de esta descripción, por ejemplo con un compuesto de la presente invención, y en la que el vehículo o excipiente no destruye la actividad biológica o farmacológica de la composición. Los polipéptidos de KI descritos en la presente memoria descriptiva pueden administrarse de forma local o sistémica mediante cualquier medio adecuado para suministro de una cantidad inhibidora de calicreína de los polipéptidos de KI a un paciente incluyendo pero sin limitarse a administraciones sistémicas como, por ejemplo, intravenosa e inhalación. Se prefiere en particular la administración parenteral.

[0056] Para administración parenteral, los polipéptidos pueden inyectarse por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. Se prefiere la administración intravenosa. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, solución salina y solución salina con tampón (que incluye tampones como fosfato o acetato), alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina, etc. Cuando es necesario, la composición puede incluir también un agente de solubilización y un anestésico local como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección, conservantes, estabilizantes, agentes de humectación, emulsionantes, sales, lubricantes, etc., en la medida en que no reaccionen de forma perjudicial con los compuestos activos. Análogamente, la composición puede comprender excipientes convencionales, por ejemplo, sustancias de vehículos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuadas para aplicación parenteral, enteral o intranasal que no reaccionen de forma perjudicial con los compuestos activos. Generalmente, los ingredientes se suministrarán por separado o mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o concentrado sin agua en un recipiente sellado herméticamente como una ampolla o un sobre que indique la cantidad de agente activo en unidades de actividad. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dispensarse con un frasco para infusión que contenga “agua para inyección” o suero salino de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se va a administrar por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o suero salino de manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

[0057] Preferentemente, los procedimientos de la presente descripción comprenden la administración de un polipéptido de KI a un paciente como una infusión intravenosa según cualquier procedimiento aprobado. Así, un polipéptido de IC descrito en la presente memoria descriptiva puede administrarse a un paciente sometido a un procedimiento IDAC similar en su momento a los usados actualmente en protocolos aprobados para administrar aprotinina y en una cantidad necesaria para proporcionar a un paciente un número o concentración requeridos de unidades inhibidoras de calicreína (KIU). Según la presente descripción, un polipéptido de KI descrito en la presente memoria descriptiva puede administrarse también a un paciente en el periodo postoperatorio inmediato, cuando pueden producirse anomalías de sangrado como consecuencia de efectos descendentes de RIS. Por ejemplo, en un procedimiento que implique DCP, puede administrarse un polipéptido de KI descrito en la presente memoria descriptiva a un paciente como una dosis de carga inicial, por ejemplo, una cantidad eficaz durante el curso de un tiempo conveniente, como 10 minutos, antes de la inducción de anestesia. A continuación, en la inducción de anestesia, puede inyectarse una segunda dosis de polipéptido de KI en el líquido de cebado de DCP ("volumen de cebado de bombeo"). A continuación puede colocarse al paciente una dosis continua y controlada de infusión intravenosa a lo largo de la duración del procedimiento quirúrgico, y después del procedimiento si así se indica.

[0058] Actualmente existen dos regímenes aprobados en los Estados Unidos para administrar aprotinina a un paciente sometido a un procedimiento IDAC (véase, etiqueta de producto y prospecto de TRASYLOL®, Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut). Uno de estos regímenes aprobados usa una dosis de carga intravenosa de 2 millones de KIU, 2 millones de KIU en el volumen de cebado de la bomba y 500.000 KIU por hora de cirugía. Otro régimen aprobado usa una dosis de carga intravenosa de 1 millón de KIU, 1 millón de KIU en el volumen de cebado de bomba y 250.000 KIU por hora de cirugía. Como estos regímenes se basan en KIU, los regímenes se adaptan fácilmente a cualquier polipéptido de KI descrito en la presente memoria descriptiva una vez que la actividad específica y las KIU de un polipéptido de KI en particular se han determinado mediante ensayos estándar. Debido a la mejora de la afinidad de unión y la actividad inhibidora en polipéptidos de KI representativos descritos en la presente memoria descriptiva con respecto a la aprotinina, se espera que dichas composiciones y

procedimientos de la presente descripción requieran probablemente menos miligramos (mg) por paciente para proporcionar a un paciente el número o la concentración requeridos de KIU.

[0059] Varias consideraciones relativas a la dosificación con un polipéptido de KI en procedimientos de la presente descripción pueden ilustrarse por medio de ejemplos con el polipéptido de KI PEP-1 representativo de la invención que tiene la secuencia amino de la SEQ ID NO: 2 (peso molecular de 7.054 dalton).

[0060] La Tabla 1, ofrecida a continuación, proporciona una comparación de la afinidad ($K_{i,app}$) del polipéptido de KI PEP-1 para calicreína y otras once proteasas plasmáticas conocidas.

Tabla 1

Sustrato de proteasa	$K_{i,app}$ (pM) de PEP-1	$K_{i,app}$ (pM) de aprotinina
calicreína plasmática humana	44	$3,0 \times 10^4$
calicreína de orina humana	$>1 \times 10^8$	$4,0 \times 10^3$
calicreína pancreática porcina	$2,7 \times 10^7$	550
C1r humana activada	$>2,0 \times 10^8$	$>1,0 \times 10^7$
C1s humana activada	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
factor XIa plasmático humano	$1,0 \times 10^4$	ND
factor XIIa plasmático humano	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
plasmina humana	$1,4 \times 10^5$	894
tripsina pancreática humana	$>2 \times 10^7$	ND
quimotripsina pancreática humana	$>2,0 \times 10^7$	$7,3 \times 10^5$
elastasa neutrófila humana	$>2,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6$
trombina plasmática humana	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$

ND = no determinado

[0061] Claramente, el polipéptido de KI PEP-1 es altamente específico de calicreína plasmática humana. Además, la afinidad ($K_{i,app}$) de PEP-1 por calicreína es 1.000 veces mayor que la afinidad de aprotinina por calicreína: la $K_{i,app}$ de PEP-1 para calicreína es de aproximadamente 44 pM (Tabla 1), mientras que la $K_{i,app}$ de aprotinina por calicreína es 30.000 pM. Así, una dosis de PEP-1 podría ser aproximadamente 1.000 veces menor que la usada para aprotinina sobre una base de moles. Sin embargo, la consideración de otros diversos factores puede proporcionar una estimación más precisa de la dosis de PEP-1 requerida en la práctica. Dichos factores incluyen la cantidad de calicreína activada durante DCP en un paciente en particular, la concentración de calicreína requerida para desencadenar una RIS y la biodisponibilidad y distribución farmacológica de PEP-1 en un paciente. No obstante, se sigue esperando que el uso de un polipéptido de KI en el procedimientos según la presente descripción y proporcionado en dosis aprobadas actualmente para el uso de aprotinina proporcione mejoras significativas con respecto al uso actual de la aprotinina bovina, de afinidad menor y menos específica.

[0062] Por ejemplo, la cantidad total de precalicreína circulante en plasma se estima en aproximadamente 500 nM (Silverberg, M. y col., "The Contact System and Its Disorders," en Blood: Principles and Practice of Hematology, Handin, R. y col., eds., JB Lippincott Co., Filadelfia, 1995). Si toda la precalicreína estuviera activada, entonces se requerirían al menos 500 nM de PEP-1 para una inhibición estequiométrica de calicreína. Un individual que tuviera 5 litros de plasma requeriría, por tanto, aproximadamente 18 mg de PEP-1 para conseguir una concentración en plasma de 500 nM.

[0063] Otro factor que debe considerarse es la concentración umbral de calicreína requerida para inducir un RIS en un paciente. Si la concentración de calicreína activa debe mantenerse por debajo, por ejemplo, de 1 nM, entonces debido a su alta afinidad por la calicreína, el PEP-1 ofrece una ventaja importante con respecto a la aprotinina en la cantidad de proteína que se requeriría para inhibir la RIS. En particular, una concentración de PEP-1 de 1 nM inhibiría el 99,6% de la calicreína presente a 1 nM (es decir, sólo hay 0,4 pM de calicreína libre residual en la sangre), mientras que una concentración de aprotinina de 1 nM sólo inhibiría el 24,5% de la calicreína presente a 1 nM. Para que la aprotinina inhiba el 99% de la calicreína a 1 nM, se requiere una concentración de aprotinina en el plasma de al menos 3 μM (es decir, una concentración 3.000 veces más elevada que para PEP-1).

[0064] Para un paciente sometido a DCP, puede estimarse una dosis clínica inicial de PEP-1 a partir de un régimen de dosis recomendada de aprotinina (1×10^6 KIU) mencionado anteriormente. Se ha comunicado que la aprotinina en un inserto envasado tiene una actividad inhibidora específica de 7.143 KIU/mg determinado usando un ensayo de presión arterial en perros. Por tanto, 1×10^6 KIU de aprotinina es equivalente a 140 mg de aprotinina (es decir, 1×10^6 KIU/7.143 KIU/mg = 140 mg de aprotinina). En un paciente que tiene un volumen plasmático en sangre de 5 litros, 140 mg corresponde a aproximadamente 4,3 μM de aprotinina (el peso molecular de aprotinina es 6.512 dalton). La actividad específica de aprotinina en el ensayo inhibidor estándar usado para PEP-1 es de 0,4 KIU/mg de polipéptido. Una dosis de 140 mg correspondería a una dosis de carga para aprotinina de 56 KIU (140 mg x 0,4 KIU/mg = 56 KIU). En cambio, como la actividad específica del polipéptido de KI PEP-1 es 10 KIU/mg en el ensayo de inhibición estándar, se requeriría una dosis de sólo 5,6 mg de PEP-1 para proporcionar el número de KIU

equivalentes a 140 mg de aprotinina. En un paciente con un volumen plasmático de 5 litros, esto corresponde a aproximadamente 160 nM de PEP-1 (el peso molecular de PEP-1 es 7.054 dalton), aunque puede requerirse una dosis más alta del polipéptido de KI PEP-1 si toda la calicreína plasmática (500 nM) se activa y/o si este polipéptido de KI está mal distribuido en un paciente.

[0065] Además, los polipéptidos de KI pueden ser de ocurrencia no natural, y pueden producirse de forma sintética o recombinante, según se observa anteriormente, con lo que se evita la posible contaminación de enfermedades transmisibles que pueden aparecer durante el aislamiento de una proteína a partir de una fuente animal natural, como en el caso de aprotinina, que se aísla del pulmón bovino. Para la aceptación administrativa y pública de un tratamiento o composición farmacéutica que comprende un polipéptido cada vez es más importante evitar la posible contaminación con y la transmisión a pacientes humanos de diversos agentes patológicos. Es de especial interés para la seguridad de las proteínas aisladas a partir de un tejido bovino la eliminación del posible riesgo de exposición a enfermedades víricas, enfermedades mediadas por bacterias y, especialmente, encefalopatías espongiformes bovinas transmisibles.

[0066] Como variantes del dominio de Kunitz 1 de la proteína LACI humana, se esperan menos efectos secundarios a partir de la administración de los polipéptidos de KI a los pacientes que con aprotinina, que es una proteína bovina que, según se ha documentado, provoca respuestas anafilácticas y anafilactoides en los pacientes, especialmente en administraciones repetidas, como procedimientos IDAC por segunda vez. Adicionalmente, la unión altamente específica de los polipéptidos de KI descritos en la presente memoria descriptiva con calicreína limitarán eficazmente o eliminarán las tendencias trombóticas observadas con la aprotinina, y reducirán los problemas observados con permeabilidad de los injertos después de los procedimientos IDAC.

[0067] A continuación se describirá la invención con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Un polipéptido de KI representativo.

[0068] Se identificó un polipéptido de KI (PEP-1) de ocurrencia no natural útil en las composiciones y procedimientos de la presente descripción, y que es un polipéptido de la presente invención, como un polipéptido de unión a calicreína mostrado en un fago recombinante a partir de una biblioteca de expresión en fagos. PEP-1 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 2). El peso molecular de PEP-1 es de 7.054 dalton.

[0069] Se aisló la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) del ADN de fago recombinante que codifica la secuencia de aminoácidos PEP-1 (aminoácidos 3-60 de la SEQ ID NO: 2) y se secuenció mediante procedimientos estándar determinados a partir de ADN de fago recombinante. Se produjo PEP-1 en cantidades útiles para caracterización adicional como una proteína recombinante en células hospedadoras de fenotipo $His4^-$ de cepa de levadura *Pichia pastoris*.

Ejemplo 2: Construcción de un plásmido recombinante para expresar polipéptidos de KI.

[0070] El plásmido inicial, pHIL-D2, es resistente a la ampicilina y contiene un alelo de tipo natural de His4 de *P. pastoris*. En la fig. 2 se muestra la secuencia de ADN final que comprende la secuencia de codificación para la proteína de fusión prepro-PEP-1 matα en el plásmido de expresión recombinante pPIC-K503. Se modificó la secuencia de ADN de pHIL-D2 para producir pPIC-K503, del modo siguiente:

1. Se eliminó el sitio BstBI en la región 3' AOX1 de pHIL-D2, situado corriente abajo del gen His4, por digestión de restricción parcial, llenado y ligamiento, alterando la secuencia de TTCGAA (SEQ ID NO: 23) a TTCGCGAA (SEQ ID NO: 24). Esta modificación se realizó para facilitar y dirigir la clonación de la casete de expresión en el plásmido.

2. Se eliminó el sitio AatII que lleva el gen bla situado corriente abajo de His4 por digestión de restricción, llenado y ligamiento modificando la secuencia de GACGTC (SEQ ID NO: 25) a GACGTACGTC (SEQ ID NO: 26). Esta modificación se realizó para facilitar la clonación de casetes de expresión que tenían sitios AatII en el plásmido. Se sintetizó el ADN que codifica PEP-1 basándose en la secuencia de nucleótidos del fago de expresión de unión a calicreína original y consistía de 450 pares de bases (pb). La secuencia de ADN final del inserto en el plásmido pHIL-D2 está flanqueada por una secuencia 5' AOX1 y una secuencia 3' AOX1 (de las que se muestran partes en la fig. 2) y codifican una proteína de fusión que comprende el péptido de señal prepro matα de *S. cerevisiae* fusionado a la secuencia de codificación estructural para el polipéptido de KI PEP-1. Se añadió el péptido de señal para facilitar la secreción de PEP-1 a partir de las células hospedadoras de levadura. Los oligonucleótidos para formar el inserto se sintetizaron y se obtuvieron comercialmente (Genesis Labs, The Woodlands, TX), y se generó el inserto por

reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN sintético ligado que codifica la proteína de fusión PEP-1/prepro matα se incorporó a continuación por ligamiento en el plásmido pHIL-D2 modificado entre los sitios BstBI y EcoRI.

[0071] Se usaron los productos de ligamiento para transformar *Escherichia coli* cepa XL1 Blue. Se usó un ensayo de PCR para cribar transformantes de *E. coli* para la construcción de plásmido deseada. Se amplificó el ADN de extractos celulares mediante PCR usando cebadores que contenían las secuencias 5' AOX1 y 3' AOX1 (véase anteriormente y la fig. 2). Se secuenciaron los productos de PCR del número correcto de pares de bases. Además, se secuenciaron aproximadamente 20-50 pb a cada lado de los sitios de clonación, y se obtuvo la secuencia predicha. En la fig. 2 se muestra la secuencia de ADN final del inserto en el plásmido pHIL-D2 (para producir plásmido pPIC-K503) junto con partes de las secuencias 5' AOX1 y 3' flanqueantes y la secuencia correspondiente de aminoácidos de la proteína de fusión que comprende el péptido de señal prepro matα de *S. cerevisiae* fusionado con la secuencia estructural de codificación para el polipéptido de KI PEP-1. Se seleccionó un transformante con la construcción de plásmido pPIC-K503 de expresión deseada, para preparar líneas celulares de levaduras para producción rutinaria de PEP-1.

Ejemplo 3: Fabricación de PEP-1 a partir de línea celular de levaduras.

[0072] Los esferoplastos de *P. pastoris* GS 115 que tienen el fenotipo His4$^-$ se transformaron con el plásmido de expresión pPIC-K503 (anterior) después de linealización del plásmido en el sitio SacI y recombinación homóloga del ADN de plásmido en el *locus* 5' AOX1 del hospedador. El fenotipo de la cepa de producción es His4$^+$. Se insertó el plásmido entero en la secuencia genómica de 5' AOX1 de la levadura.

[0073] Se cribaron los aislados de la transformación para conocer el crecimiento en ausencia de histidina exógena con metanol como única fuente de carbono. Más del 95% de los transformantes conservaron la capacidad del tipo natural de crecer con metanol como única fuente de carbono, demostrando con ello que el plásmido se había insertado en el genoma del hospedador por recombinación homóloga más que por transposición. Estos transformantes no requerían histidina exógena para crecimiento, demostrando con ello que el plásmido se había integrado en el genoma del hospedador. Se clonaron las colonias seleccionadas. Se realizaron estudios de expresión en pequeño cultivo para identificar clones que secretan los niveles más altos de PEP-1 activo en el medio de cultivo. Se cuantificaron los niveles de secreción de PEP-1 en soluciones de sobrenadante de cultivo clarificado en cuanto a los niveles de PEP-1 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con dodecilsulfato de sodio y se evaluó la inhibición de calicreína. Se seleccionó un clon de la levadura para producción de PEP-1 basada en su alto nivel de expresión de PEP-1 entre los cultivos muestreados.

[0074] Se prepararon comercialmente bancos de células maestros y de trabajo de *P. pastoris* que producen PEP-1 (MDS Pharma Services, Bothell, Washington). Una producción estándar de PEP-1 en levadura comprendía tres etapas, del modo siguiente: (1) preparación del cultivo por siembra, (2) fermentación, y (3) recuperación del cultivo.

[0075] La etapa de cultivo por siembra consistía en la inoculación de seis matraces (300 mL cada uno) que contenían caldo de inóculo estéril (base de nitrógeno de levadura, fosfato de potasio y glicerol, pH = 5) con el contenido de un único vial de un banco de células de trabajo de *P. pastoris* que produce PEP-1. Se inocularon los matraces en un agitador orbital (300 rpm) durante aproximadamente 13 horas a 30°C ± 2°C.

[0076] Se realizaron fermentaciones en un fermentador Braun cerrado de 100 litros lleno con caldo estéril. Se inició cada fermentación con la transferencia del contenido de los seis matraces de cultivo por siembra al fermentador. Después de aproximadamente 24 horas, el glicerol en el fermentador se agotó y se añadió glicerol adicional durante aproximadamente 8 horas más.

[0077] A continuación se inició una fase de alimentación mixta, que duró aproximadamente 83 horas, mediante la adición de un suministro de glicerol y metanol. Al final de este tiempo, se terminó la fermentación, y se diluyó el contenido del fermentador con agua purificada. La purificación y el procesamiento de PEP-1 consistieron en cinco etapas, del modo siguiente: (1) cromatografía de lecho expandido, (2) cromatografía por intercambio de cationes, (3) cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), (4) ultrafiltración y diafiltración, y (5) filtración final y envasado.

[0078] La etapa de purificación inicial consistió en cromatografía de lecho expandido. Se aplicó el cultivo del fermentador diluido a la columna equilibrada empaquetada con resina Streamline SP (cromatografía en columna Amersham Pharmacia Streamline 200, Amersham Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey). A continuación se lavó la columna (ácido acético 50 mM, pH = 3,0 a 3,5) en un modo de flujo ascendente para arrastrar las células de levadura desde el lecho expandido. Se levantó el adaptador superior por encima del lecho expandido para mejorar el lavado. Se detuvo el flujo y se dejó que se sedimentara el lecho. Se bajó el adaptador de manera que estuviera ligeramente por encima del lecho sedimentado. Se invirtió la dirección del flujo. Se recogió el efluente. Se continuó el lavado en modo descendente usando acetato de sodio 50 mM, pH 4,0. Se recogió el efluente. Se eluyó PEP-1 a

partir de la columna usando acetato de sodio 50 mM, pH 6,0. Se recogió el eluato en un recipiente de 50 litros. A continuación se filtró el eluato a través de un filtro 0,22 μ en un recipiente limpio situado en el sitio de purificación. Se recogieron muestras adicionales para la determinación de concentración de PEP-1. A continuación se realizó una etapa de cromatografía de intercambio de cationes usando el eluato filtrado a partir de la columna de lecho expandido. Se eluyó PEP-1 a partir de la columna usando citrato de trisodio 15 mM, pH 6,2.

[0079] Se eliminaron las proteínas adicionales de la preparación de PEP-1 por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Antes de la HIC, se diluyó el eluato a partir de la columna de intercambio de cationes con sulfato de amonio. Se aplicó el eluato a la columna, y se eluyó el PEP-1 usando sulfato de amonio (0,572 M) en fosfato de potasio (100 mM), pH 7,0. Se recogió el eluato en fracciones basadas en valores A280. Se recogieron todas las fracciones en frascos de PETG tarados estériles.

[0080] Se reunieron las fracciones seleccionadas en un recipiente limpio. Se concentró el conjunto por ultrafiltración. La preparación de PEP-1 concentrado se sometió inmediatamente a diafiltración frente a diez volúmenes de PBS, pH 7,0.

[0081] Se realizó una etapa de filtración final antes del envasado con el fin de reducir al mínimo la biocarga en el PEP-1 en volumen. Se filtró la solución en volumen a través de un filtro 0,22 μ y se recogió en un frasco de PETG tarado estéril. Se eliminó una muestra para prueba de liberación de lotes. El resto del volumen se dispensó asépticamente en frascos de PETG estériles y se almacenó a -20°C.

Ejemplo 4: Ensayo de inhibición de calicreína.

[0082] Se usó una prueba cinética para medir la actividad inhibidora de polipéptidos de KI, como PEP-1. El ensayo cinético mide la fluorescencia después de escisión mediada por calicreína de un sustrato, prolilfenilalanilarginilaminometilcumarina. Se incubó una cantidad conocida de calicreína con un muestras de un estándar de referencia de polipéptido de KI diluidas en serie o y de prueba de polipéptidos de KI diluidas en serie, en un tampón de reacción adecuado en una placa de microvaloración. Cada muestra se obtuvo por triplicado. Se añadió la solución del sustrato, y se leyó la placa inmediatamente usando una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Se requería que al menos dos de cada una de las curvas de las muestras y estándar de referencia tuvieran un valor de R cuadrado de 0,95 para ser consideradas válidas.

[0083] Aunque esta invención se ha mostrado y descrito en particular con referencias a las formas de realización preferidas de la misma, los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y en los detalles en la misma sin separarse del ámbito de la invención comprendido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 de la SEQ ID NO: 2), en el que el polipéptido inhibe la calicreína plasmática.

2. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 de la SEQ ID NO: 2).

3. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos: Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 2).

4. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según la reivindicación 1 y uno o más tampones, vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables.

5. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 de la SEQ ID NO: 2).

6. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos: Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 2).

7. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que la composición es un polvo seco liofilizado.

8. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que la composición se formula para administración subcutánea.

9. Un recipiente que comprende la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.

10. El recipiente según la reivindicación 9, en el que el recipiente es un frasco para infusión.

11. Una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

12. La molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 11, en la que dicha secuencia de ácidos nucleicos codifica el polipéptido según la reivindicación 3.

Figura 1

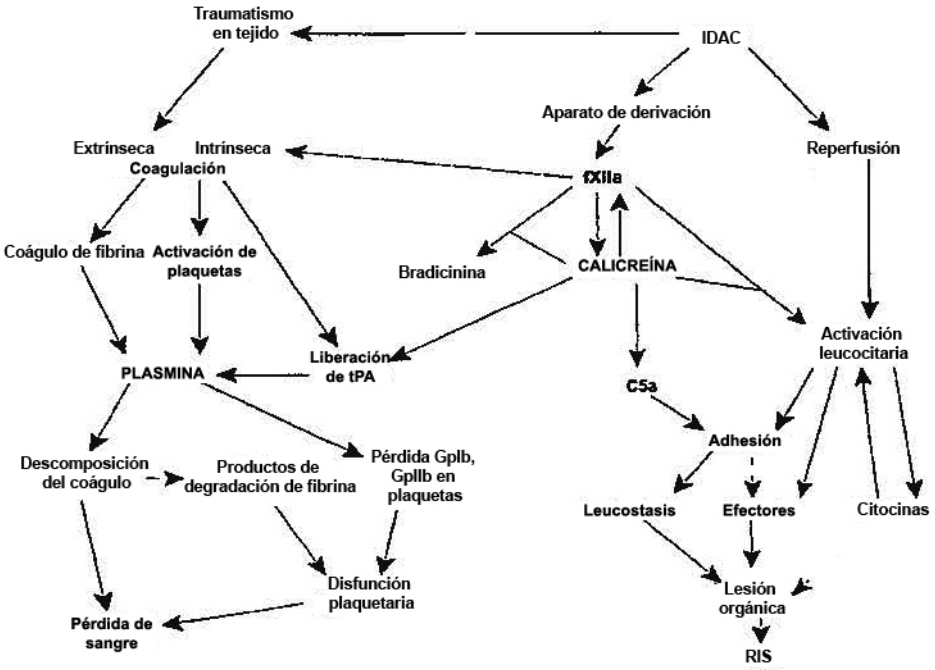

Traumatismo en tejido
IDAC
Aparato de derivación
Extrínseca
Intrínseca
Coagulación
Reperfusión
fXIIa
Coágulo de fibrina
Activación de plaquetas
Bradicinina
CALICREÍNA
Activación leucocitaria
Liberación de tPA
PLASMINA
C5a
Adhesión
Descomposición del coágulo
Productos de degradación de fibrina
Pérdida GpIb, GpIIb en plaquetas
Leucostasis
Efectores
Citocinas
Disfunción plaquetaria
Lesión orgánica
Pérdida de sangre
RIS

Figura 2

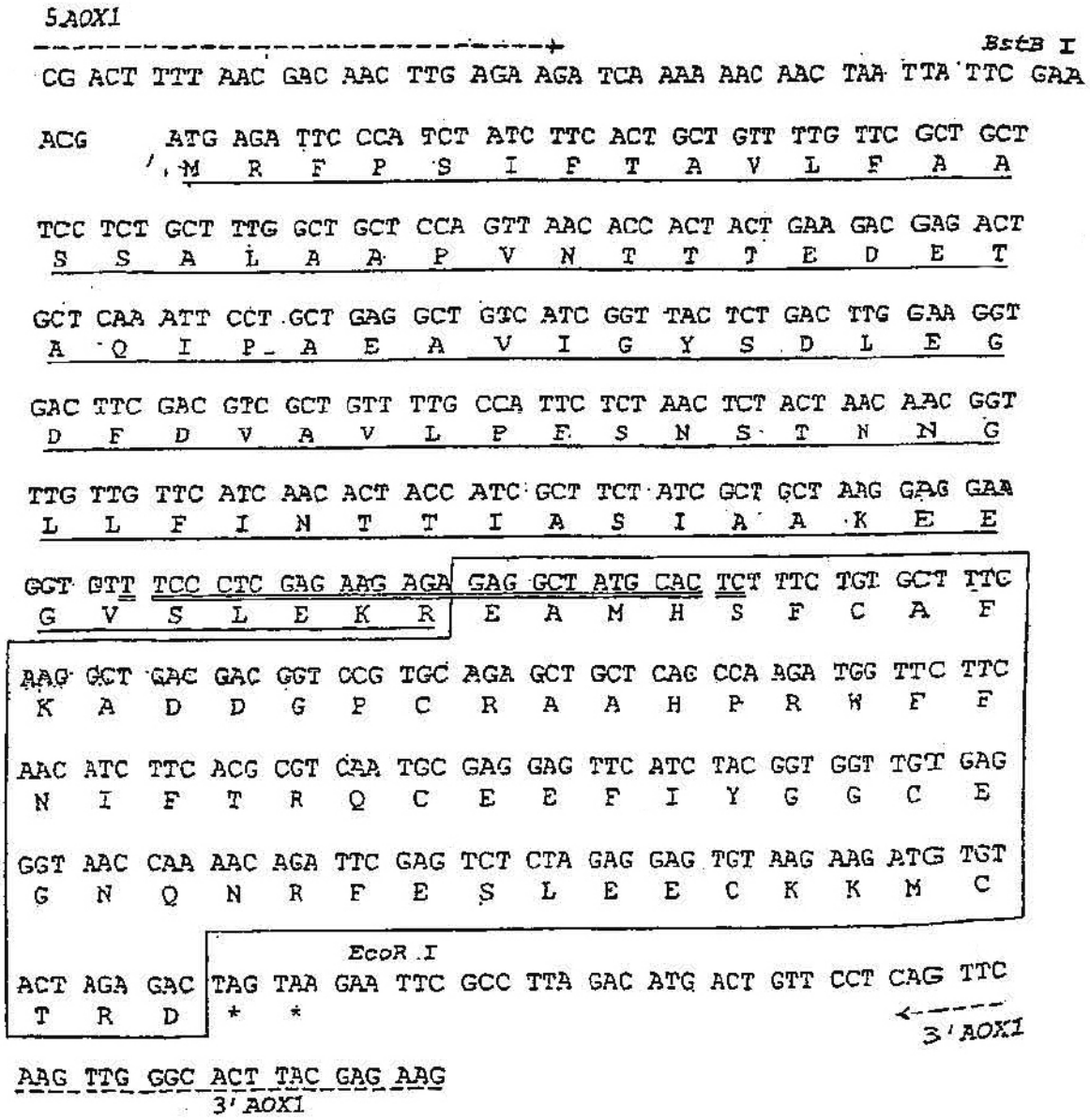

5AOX1
BstB I
CG ACT TTT AAC GAC AAC TTG AGA AGA TCA AAA AAC AAC TAA TTA TTC GAA
ACG ATG AGA TTC CCA TCT ATC TTC ACT GCT GTT TTG TTC GCT GCT
M R F P S I F T A V L F A A
TCC TCT GCT TTG GCT GCT CCA GTT AAC ACC ACT ACT GAA GAC GAG ACT
S S A L A A P V N T T T E D E T
GCT CAA ATT CCT GCT GAG GCT GTC ATC GGT TAC TCT GAC TTG GAA GGT
A Q I P A E A V I G Y S D L E G
GAC TTC GAC GTC GCT GTT TTG CCA TTC TCT AAC TCT ACT AAC AAC GGT
D F D V A V L P F S N S T N N G
TTG TTG TTC ATC AAC ACT ACC ATC GCT TCT ATC GCT GCT AAG GAG GAA
L L F I N T T I A S I A A K E E
GGT GTT TCC CTC GAG AAG AGA GAG GCT ATG CAC TCT TTC TGT GCT TTC
G V S L E K R E A M H S F C A F
AAG GCT GAC GAC GGT CCG TGC AGA GCT GCT CAC CCA AGA TGG TTC TTC
K A D D G P C R A A H P R W F F
AAC ATC TTC ACG CGT CAA TGC GAG GAG TTC ATC TAC GGT GGT TGT GAG
N I F T R Q C E E F I Y G G C E
GGT AAC CAA AAC AGA TTC GAG TCT CTA GAG GAG TGT AAG AAG ATG TGT
G N Q N R F E S L E E C K K M C
EcoR I
ACT AGA GAC TAG TAA GAA TTC GCC TTA GAC ATG ACT GTT CCT CAG TTC
T R D * *
3' AOX1
AAG TTG GGC ACT TAC GAG AAG
3' AOX1

FIGURA 3A

```
SEQ ID 2:   (amino ácidos 3-60)  ----MHSFCAFKA-DDGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFIYGG
SEQ ID 4:                        ----MHSFCAFKA-DDGPCKANHLRFFFNIFTRQCEEFSYGG
SEQ ID 5:                        ----MHSFCAFKA-DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEEFTYGG
SEQ ID 6:                        ----MHSFCAFKA-DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEQFTYGG
SEQ ID 7:                        ----MHSFCAFKA-DDGHCKASLPRFFFNIFTRQCEEFIYGG
SEQ ID 8:                        ----MHSFCAFKA-DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEEFSYGG
SEQ ID 9:                        ----MHSFCAKFA-DDGHCKGAHLRFFFNIFTRQCEEFIYGG
SEQ ID 10:                       ----MHSFCAFKA-DDGRCKGAHLRFFFNIFTRQCEEFIYGG
SEQ ID 11:                       ----MHSFCAFKA-DGGRCRGAHPRWFFNIFTRQCEEFSYGG
SEQ ID 12:                       ----MHSFCAFKA-DDGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFSYGG
SEQ ID 13:                       ----MHSFCAFKA-DVGRCRGAHPRWFFNIFTRQCEEFSYGG
SEQ ID 14:                       ----MHSFCAFKA-DVGRCRGAQPRFFFNIFTRQCEEFSYGG
SEQ ID 15:                       ----MHSFCAFKA-DDGSCRAAHLRWFFNIFTRQCEEPSYGG
SEQ ID 16:                       ----MHSFCAFKA-EGGSCRAAHQRWFFNIFTRQCEEFSYGG
SEQ ID 17:                       ----MHSFCAFKA-DDGPCRGAHLRFFFNIFTRQCEEFSYGG
SEQ ID 18:                       ----MHSFCAFKA-DDGHCRGALPRWFFNIFTRQCEEFSYGG
SEQ ID 19:                       ----MHSFCAFKA-DSGNCRGNLPRFFFNIFTRQCEEFSYGG
SEQ ID 20:                       ----MHSFCAFKA-DSGRCRGNHQRFFFNIFTRQCEEFSYGG
SEQ ID 21:                       ----MHSFCAFKA-DGGRCRAIQPRWFFNIFTRQCEEFSYGG
SEQ ID 22:                       ----MHSFCAFKA-DDGRCRGAHPRWFFNIFTRQCEEFSYGG
BPTI (SEQ ID 29):                ----RPDFCLEPP-YTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGG
ITI-D1 (SEQ ID 30):              ----KEDSCQLGY-SAGPCMGMTSRYFYNGTSMACETFQYGG
ITI-D2 (SEQ ID 31):              ----TVAACNLPI-VRGPCRAFIQLWAFDAVKGKCVLFPYGG
LACI-D1 (SEQ ID 32):             ----MHSFCAFKA-DDGPCKAIMKRFFFNIFTRQCEEFIYGG
LACI-D2 (SEQ ID 33):             ----KPDFCFLEE-DPGICRGYITRYFYNNQTKQCERFKYGG
LACI-D3 (SEQ ID 34):             ----GPSWCLTPA-DRGLCRANENRFYYNSVIGKCRPFKYSG
HKI B9 (SEQ ID 35):              ----LPNVCAFPM-EKGPCQTYMTRWFFNFETGECELFAYGG
C=3 (SEQ ID 36):                 ----ETDICKLPK-DEGTCRDFILKWYYDPNTKSCARFWYGG
TFPI-2 D1 (SEQ ID 37):           ----NAEICLLPL-DYGPCRALLLRYYYDRYTQSCRQFLYGG
TFPI-2 D2 (SEQ ID 38):           ----VPKVCRLQVSVDDQCEGSTEKYFFNLSSMTCEKFFSGG
TFPI-2 D3 (SEQ ID 39):           ----IPSFCYSPK-DEGLCSANVTRYYFNPRYRTCDAFTYTG
APP-I (SEQ ID 40):               ---RNREVCSEQA-ETGPCRAMISRWYFDVTEGKCAPFFYGG
EpiNE7 (SEQ ID 41):              ----RPDFCLEPP-YTGPCVAMFPRYFYNAKAGLCQTFVYGG
BITI-E7-141 (SEQ ID 42):         ----RPDFCQLGY-SAGPCVAMFPRYFYNGTSMACQTFVYGG
MUTT26A (SEQ ID 43):             ----RPDFCQLGY-SAGPCVAMFPRYFYNGASMACQTFVYGG
MUTQE (SEQ ID 44):               ----RPDFCQLGY-SAGPCVAMFPRYFYNGTSMACETFVYGG
MUT1619 (SEQ ID 45):             ----RPDFCQLGY-SAGPCVGMFSRYFYNGTSMACQTFVYGG
EPI-HNE-1 (SEQ ID 46):          EAEARPDFCLEPP-YTGPCIAFFPRYFYNAKAGLCQTFVYGG
EPI-HNE-2 (SEQ ID 47):           ------AACNLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFPYGG
EPI-HNE-3 (SEQ ID 48):           ------AACNLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFPYGG
EPI-HNE-4 (SEQ ID 49):           ------EACNLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFPYGG
DPI14 KR (SEQ ID 50):            --EAVREVCSEQA-ETGPCIAFFPRWYFDVTEGKCAPFFYGG
DPI24 KR (SEQ ID 51):            --EANAEICLLPL-DYGPCIAFFPRYYYDRYTQSCRQFLYGG
DPI68 KR (SEQ ID 52):            --EAKPDFCFLEE-DPGICIGFFPRYFYNNQAKQCERFVYGG
DPI84 KR (SEQ ID 53):            --EAETDICKLPK-DEGTCIAFFPRWYYDPNTKSCARFVYGG
```

FIGURA 3B

SEQ ID 2:	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 4:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 5:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 6:	(cont.)	CAGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 7:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 8:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 9:	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 10:	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 11:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 12:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 13:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 14:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 15:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 16:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 17:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 18:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 19:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 20:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 21:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 22:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
BPTI (SEQ ID 29):	(cont.)	CRAKR--NNFKSAEDCMRTCGGA
ITI-D1 (SEQ ID 30):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKECLQTCRTV
ITI-D2 (SEQ ID 31):	(cont.)	CQGNG--NKFYSEKECREYCGVP
LACI-D1 (SEQ ID 32):	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
LACI-D2 (SEQ ID 33):	(cont.)	CLGNM--NNFETLEECKNICEDG
LACI-D3 (SEQ ID 34):	(cont.)	CGGNE--NNFTSKQECLRACKKG
HKI B9 (SEQ ID 35):	(cont.)	CGGNS--NNFLRKEKCEKFCKFT
C=3 (SEQ ID 36):	(cont.)	CGGNE--NKFGSQKECEKVCAPV
TFPI-2 D1 (SEQ ID 37):	(cont.)	CEGNA--NNFYTWEACDDACWRI
TFPI-2 D2 (SEQ ID 38):	(cont.)	CHRNRIENRFPDEATCMGFCAPK
TFPI-2 D3 (SEQ ID 39):	(cont.)	CGGND--NNFVSREDCKRACAKA
APP-I (SEQ ID 40):	(cont.)	CGGNR--NNFDTEEYCMAVCGSA
EpiNE7 (SEQ ID 41):	(cont.)	CMGNG--NNFKSAEDCMRTCGGA
BITI-E7-141 (SEQ ID 42):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
MUTT26A (SEQ ID 43):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
MUTQE (SEQ ID 44):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
MUT1619 (SEQ ID 45):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
EPI-HNE-1 (SEQ ID 46):	(cont.)	CMGNG--NNFKSAEDCMRTCGGA
EPI-HNE-2 (SEQ ID 47):	(cont.)	CQGNG--NKFYSEKECREYCGVP
EPI-HNE-3 (SEQ ID 48):	(cont.)	CQGNG--NKFYSEKECREYCGVP
EPI-HNE-4 (SEQ ID 49):	(cont.)	CQGNG--NKFYSEKECREYCGVP
DPI14 KR (SEQ ID 50):	(cont.)	CGGNR--NNFDTEEYCMAVCGSA
DPI24 KR (SEQ ID 51):	(cont.)	CEGNA--NNFYTWEACDDACWRI
DPI68 KR (SEQ ID 52):	(cont.)	CLGNM--NNFETLEECKNICEDG
DPI84 KR (SEQ ID 53):	(cont.)	CGGNE--NKFGSQKECEKVCAPV