

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 561**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/81** (2006.01)  
**A61K 38/57** (2006.01)  
**C12Q 1/37** (2006.01)  
**C12N 9/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04022346 .3**  
96 Fecha de presentación: **11.01.1995**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1489097**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2004**

54 Título: **INHIBIDORES DE LA PLASMINA HUMANA DERIVADOS DE DOMINIOS KUNITZ Y ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN LOS MISMOS.**

30 Prioridad:  
**11.01.1994 US 179658**  
**10.03.1994 US 208265**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.03.2012**

73 Titular/es:  
**DYAX CORPORATION**  
**300 TECHNOLOGY SQUARE, 8TH FLOOR**  
**CAMBRIDGE, MA 02139, US**

72 Inventor/es:  
**Markland, William y**  
**Ladner, Robert Charles**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 375 561 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la plasmina humana derivados de dominios Kunitz y ácidos nucleicos que codifican los mismos

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

#### Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a nuevos mutantes del primer dominio Kunitz ( $K_1$ ) del inhibidor de coagulación asociado a lipoproteínas LACI humano, que inhibe la plasmina. La invención también se refiere a otros dominios Kunitz modificados que inhiben la plasmina y a otros inhibidores de plasmina.

#### Descripción de la técnica anterior

10 El agente principal responsable de la fibrinólisis es la plasmina, la forma activada del plasminógeno. Muchas sustancias pueden activar el plasminógeno, incluyendo el factor Hageman activado, estreptoquinasa, uroquinasa (uPA), activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA), calicreína plasmática (pKA). La pKA es tanto un activador de la forma de zimógeno de la uroquinasa como un activador directo de plasminógeno.

15 La plasmina no se puede detectar en la sangre que circula normal, pero el plasminógeno, el zimógeno, está presente en una concentración de aproximadamente 3  $\mu$ M. Una cantidad adicional, no medida, del plasminógeno está unida a fibrina y otros componentes de la matriz extracelular y superficies celulares. La sangre normal contiene el inhibidor fisiológico de la plasmina, el inhibidor de plasmina  $\alpha_2$  ( $\alpha_2$ -PI), en una concentración de aproximadamente 2  $\mu$ M. La plasmina y el  $\alpha_2$ -PI forman un complejo 1:1. La plasmina unida a la matriz o a la célula está relativamente inaccesible para la inhibición por el  $\alpha_2$ -PI. Por lo tanto, la activación de la plasmina puede superar la capacidad neutralizante del  $\alpha_2$ -PI produciendo un estado profibrinolítico.

20 Una vez formada, la plasmina:

- i. degrada los coágulos de fibrina, a veces de forma prematura;
  - ii. digiere el fibrinógeno (el material estructural de los coágulos) deteriorando la hemostasia produciendo la formación de coágulos disgregables y que son lisados fácilmente a partir de los productos de degradación, y la inhibición de la adhesión/agregación de plaquetas por los productos de degradación del fibrinógeno;
  - 25 iii. interacciona directamente con las plaquetas para escindir las glicoproteínas Ib y IIb/IIIa impidiendo la adhesión al endotelio dañado en zonas de flujo sanguíneo de alta tensión de cizallamiento, y deteriorando la respuesta de agregación necesaria para la formación de tapones de plaquetas (ADEL86);
  - iv. inactiva enzimas proteolíticamente en la ruta de coagulación extrínseca promoviendo además un estado proteolítico.
- 30

Robbins (ROBB87) revisó con detalle el sistema de plasminógeno-plasmina.

#### **Fibrinólisis y fibrinogenolisis**

35 La fibrinólisis y fibrinogenolisis inadecuadas que conducen a la hemorragia excesiva son una complicación frecuente en los procedimientos quirúrgicos que requieren circulación extracorpórea, tal como la circulación extracorpórea y también se encuentra en la terapia trombolítica y el trasplante de órganos, particularmente de hígado. Otras afecciones clínicas caracterizadas por una alta incidencia de diátesis hemorrágica incluyen cirrosis hepática, amiloidosis, leucemia promielocítica aguda y tumores sólidos. La restauración de la hemostasia requiere la infusión de plasma y/o productos del plasma, la cual tiene riesgo de reacciones inmunológicas y exposición a patógenos, por ejemplo virus de la hepatitis y VIH.

40 Una pérdida muy grande de sangre puede no resolverse incluso con infusión masiva. Cuando se considera potencialmente mortal, la hemorragia se trata con antifibrinolíticos tales como ácido  $\epsilon$ -amino-caproico (véase HOOV93) (EACA), ácido tranexámico o aprotinina (NEUH98). La aprotinina también se conoce como Trasylol<sup>®</sup> y como inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI). En lo sucesivo, la aprotinina se denominará "BPTI". El EACA y el ácido tranexámico sólo impiden la unión de la plasmina a la fibrina por unión a los kringles, dejando así a la plasmina como una proteasa libre en el plasma. El BPTI es un inhibidor directo de la plasmina y es el más eficaz de estos agentes. Debido a las potenciales complicaciones trombóticas, toxicidad renal, y en el caso del BPTI, inmunogenicidad, estos agentes se usan con precaución y normalmente se reservan como "último recurso" (PUTT89). Los tres agentes antifibrinolíticos carecen de especificidad y afinidad de objetivo, e interaccionan con tejidos y órganos por rutas metabólicas no caracterizadas. Las grandes dosis necesarias debido a la baja afinidad, los efectos secundarios debidos a la falta de especificidad y la potencial reacción inmunitaria y toxicidad en

50

órganos/tejidos, se unen contra el uso de estos antifibrinolíticos para la prevención profiláctica de hemorragias o como terapia postoperatoria rutinaria, para evitar o reducir la terapia por transfusión. Por lo tanto, se necesita un antifibrinolítico seguro. Los atributos esenciales de dicho agente son:

- i. Neutralización de la o las enzimas fibrinolíticas objetivo relevantes;
- 5 ii. Alta afinidad de unión a las enzimas objetivo para minimizar la dosis;
- iii. Alta especificidad por el objetivo, para reducir los efectos secundarios; y
- iv. Alto grado de similitud con la proteína humana para minimizar la potencial inmunogenicidad y/o toxicidad en órganos/tejidos.

10 Todas las enzimas fibrinolíticas que son objetivos candidatos para la inhibición mediante un antifibrinolítico eficaz son serina proteasas homólogas a la quimiotripsina.

**Hemorragia excesiva**

15 La hemorragia excesiva puede ser el resultado de una actividad de coagulación deficiente, elevada actividad fibrinolítica, o una combinación de los dos procesos. En la mayoría de las diátesis hemorrágicas se debe controlar la actividad de la plasmina. Se cree que el efecto clínico beneficioso del BPTI en la reducción de la pérdida de sangre resulta de la inhibición de la plasmina ( $K_D \sim 0,3 \text{ nM}$ ) o la calicreína plasmática ( $K_D \sim 100 \text{ nM}$ ) o ambas enzimas.

20 En GARD93 se revisan los trombolíticos actualmente usados, diciendo que aunque los agentes trombolíticos (por ejemplo, tPA) abren los vasos sanguíneos, la hemorragia excesiva es un problema de seguridad grave. Aunque el tPA y la estreptoquinasa tienen semividas en el plasma cortas, la plasmina que activan permanece en el sistema durante un periodo de tiempo largo, y como se ha expuesto, el sistema es potencialmente deficiente en inhibidores de plasmina. Por lo tanto, la activación excesiva de plasminógeno puede conducir a una incapacidad de coagular peligrosa y a hemorragias perjudiciales o mortales: en dichos casos sería útil un inhibidor de plasmina potente y altamente específico.

25 El BPTI es un inhibidor de plasmina potente, sin embargo, se ha encontrado que es suficientemente antígeno para que los segundos usos requieran ensayo de la piel. Además, las dosis de BPTI necesarias para controlar la hemorragia son bastante altas y el mecanismo de acción no está claro. Algunos dicen que el BPTI actúa sobre la plasmina, mientras que otros dicen que actúa inhibiendo la calicreína del plasma. En FRAE89 se describe que dosis de aproximadamente 840 mg de BPTI a 80 pacientes de cirugía a corazón abierto, redujeron la pérdida de sangre en casi la mitad, y la cantidad media de transfusión disminuyó en 74%. Miles Inc. ha introducido recientemente el Trasylol en EE.UU. para reducir la hemorragia en cirugía (véase el folleto del producto de Miles sobre el Trasylol).

30 En LOHM93 se sugiere que los inhibidores de plasmina pueden ser útiles para controlar la hemorragia en la cirugía ocular. En SHER89 se describe que el BPTI puede ser útil para limitar la hemorragia en la cirugía de colon.

Un inhibidor de plasmina que es aproximadamente tan potente como el BPTI o más potente, pero que es casi idéntico a un dominio de proteína humana, ofrece un potencial terapéutico similar, pero tiene menor potencial antigénico.

35 **Angiogénesis:**

La plasmina es la enzima clave en la angiogénesis. En OREI94 se describe que un fragmento de 38 kDa de la plasmina (que carece del dominio catalítico) es un potente inhibidor de la metástasis, indicando que la inhibición de la plasmina podría ser útil para bloquear la metástasis de tumores (FIDL94). Véase también ELLI92.

**Plasmina**

40 La plasmina es una serina proteasa derivada del plasminógeno. El dominio catalítico de la plasmina (o "CatDom") corta enlaces peptídicos, en particular después de restos de arginina y en menor medida después de lisinas, y es altamente homólogo a la tripsina, quimiotripsina, calicreína, y muchas otras serina proteasas. La mayor parte de la especificidad de la plasmina deriva de la unión de la fibrina a los kringles (LUCA83, VARA83, VARA84). Cuando se activa, se corta el enlace entre Arg<sub>561</sub>-Val<sub>562</sub>, permitiendo que los extremos amino libres recién formados formen un puente salino. Sin embargo, los kringles permanecen unidos al CatDom por dos disulfuros (COLM87, ROBB87).

45 Se ha descrito que el BPTI inhibe la plasmina con una  $K_D$  de aproximadamente 300 pM (SCHN86). En AUER88 se describe que el BPTI (R<sub>15</sub>) tiene una  $K_i$  para la plasmina de aproximadamente 13 nM, sugiriendo que R<sub>15</sub> es sustancialmente peor que K<sub>15</sub> para la unión a la plasmina. En SCHN86 se describe que el BPTI en el que los restos C<sub>14</sub> y C<sub>38</sub> se han convertido en alanina, tiene una  $K_i$  para la plasmina de 4,5 nM. En KIDO88 se describe que el APP-I tiene una  $K_i$  para la plasmina de aproximadamente 75 pM ( $7,5 \times 10^{-11} \text{ M}$ ), el inhibidor más potente de la plasmina humana descrito hasta ahora. Sin embargo, en DENN94a se describe que el APP-I inhibe la plasmina con una  $K_i =$

225 nM ( $2,25 \times 10^{-7}$  M). La segunda y tercera bibliotecas de los autores de la presente invención se diseñaron suponiendo que el APP-I es un potente agente de unión a la plasmina. El procedimiento de selección no selecciona los restos del APP-I en la mayoría de las localizaciones, y en la descripción de DENN94a se explica por qué se produce esto.

- 5 Con técnicas de ADN recombinante, se puede obtener una nueva proteína por expresión de un gen mutado que codifica un mutante del gen de la proteína nativa. Se conocen varias estrategias para seleccionar mutaciones. En una estrategia, se mantienen constantes algunos restos, otros se mutan de forma aleatoria, y otros más se mutan de una forma predeterminada. Esto se llama "variegación" y lo definen Ladner et al. en el documento USP 5.223.409, que se incorpora por referencia.
- 10 En DENN94a y DENN94b se describen selecciones de dominios de Kunitz basadas en el APP-I para la unión al complejo del factor tisular con el factor VII. No usaron LACI-K1 como origen y no usaron plasmina como objetivo. El agente de unión de mayor afinidad que obtuvieron tenía una  $K_D$  para su objetivo de aproximadamente 2 nM. Los seleccionados en el primer ciclo por los autores de la invención tienen una afinidad de este orden, pero los seleccionados en el segundo ciclo son aproximadamente 25 veces mejores que estos.
- 15 Se supone que es menos probable que las proteínas cogidas de una especie particular produzcan una respuesta inmunitaria cuando se inyectan a individuos de esa especie. Los anticuerpos murinos son altamente antígenos en seres humanos. Los anticuerpos "quiméricos" que tienen dominios constantes humanos y dominios variables murinos son indudablemente menos antígenos. Los anticuerpos llamados "humanizados" tienen dominios constantes humanos y dominios variables en los que las CDR se cogen de anticuerpos murinos mientras que la región armazón de los dominios variables son de origen humano. Los anticuerpos "humanizados" son mucho menos antígenos que los anticuerpos "quiméricos". En un anticuerpo "humanizado", de 50 a 60 restos de la proteína no son de origen humano. Las proteínas de esta invención comprenden, en la mayoría de los casos, sólo aproximadamente 60 aminoácidos, y normalmente hay diez diferencias o menos entre la proteína diseñada y la proteína parental. Aunque los seres humanos desarrollan anticuerpos incluso contra proteínas humanas, tales como la insulina humana, dichos anticuerpos tienden a unirse débilmente y con frecuencia no impiden que la proteína inyectada presente su función biológica pretendida. El uso de una proteína de la especie que se va a tratar no garantiza que no haya respuesta inmunitaria. Sin embargo, la selección de una proteína con una secuencia muy próxima a una proteína humana reduce mucho el riesgo de una respuesta inmunitaria fuerte en seres humanos.
- 20 Los dominios Kunitz son muy estables y se pueden producir eficazmente en levaduras u otros organismos hospedantes. Se han descrito al menos diez dominios Kunitz humanos. Aunque en cierto momento se pensó que el APP-I era un potente inhibidor de plasmina, realmente no hay dominios Kunitz humanos que inhiban la plasmina tan bien como lo hace el BPTI. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar secuencias del dominio Kunitz que sean tanto potentes inhibidores de plasmina como que tengan una secuencia próxima a los dominios Kunitz humanos.
- 25 Se conoce en la técnica el uso de la mutagénesis de sitio específico, sea aleatoria o no aleatoria, para obtener proteínas de unión mutantes con mejor actividad, pero el éxito no está asegurado.

### SUMARIO DE LA INVENCION

Esta invención describe mutantes de dominios Kunitz homólogos al BPTI que inhiben potentemente la plasmina humana. En particular, esta invención describe mutantes de un dominio de LACI humano, que es probable que no sean inmunógenos para seres humanos, y que inhiben la plasmina con una  $K_D$ , preferiblemente, de aproximadamente 5 nM o menos, más preferiblemente de aproximadamente 300 pM o menos, y lo más preferiblemente de aproximadamente 100 pM o menos. La invención también describe el uso terapéutico y de diagnóstico de estas nuevas proteínas.

45 Las proteínas inhibitoras de la plasmina son útiles para prevenir o tratar afecciones clínicas producidas o exacerbadas por la plasmina, incluyendo la fibrinólisis o fibrinogenolisis inadecuadas, hemorragia excesiva asociada con trombolíticos, hemorragia postoperatoria y androgénesis inadecuada. Los mutantes que se unen a la plasmina, sean o no inhibidores, son útiles para el ensayo de la plasmina en muestras, in vitro, para la generación de imágenes de zonas de actividad de la plasmina, in vivo, y para la purificación de la plasmina.

50 Se seleccionaron los mutantes preferidos QS4 y NS4 de una biblioteca que tenía aproximadamente 50 millones de proteínas que tenían variabilidad en las posiciones 13, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 34 y 39. Estas proteínas tienen una secuencia de aminoácidos prácticamente idéntica a una proteína humana, pero inhiben la plasmina con una  $K_i$  de aproximadamente 2 nM (es decir, aproximadamente 6 veces menos potente que el BPTI, pero 100 veces mejor que la APP-I).

55 Se seleccionó una proteína especialmente preferida, SPI11, de una biblioteca que permite variabilidad en las posiciones 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19 y 21, y tiene una afinidad por la plasmina que es menor que 100 pM (es

decir, aproximadamente 3 veces superior al BPTI en la unión), y además tiene una secuencia mucho más parecida al LACI, una proteína humana, que al BPTI, una proteína bovina. Otros mutantes de LACI-K1 seleccionados de esta biblioteca y que se piensa que tienen una afinidad muy alta por la plasmina, incluyen SPI15, SPI08 y SPI23. Se ha cribado una biblioteca adicional que permite variación en las posiciones 10, 11, 13 15, 16, 17, 18, 19, 21, 31, 32, 34, 35 y 39, y se ha encontrado una secuencia de consenso (SPIcon1). Las variantes que se ha mostrado que son mejores que QS4, y por lo tanto más preferidas, incluyen SPI15 y SPI47. Se han identificado secuencias que es probable que tengan una afinidad muy alta por la plasmina y retengan todavía una secuencia de aminoácidos esencialmente humana, e incluyen las secuencias de SPI60, SPI59, SPI42, SPI55, SPI56, SPI52, SPI46, SPI49, SPI53, SPI41 y SPI57. La información de la secuencia de aminoácidos que confiere una alta afinidad por el sitio activo de la plasmina se puede transferir a otros dominios Kunitz, particularmente a dominios Kunitz de origen humano; se describen diseños de varias de dichas proteínas.

Los inhibidores de plasmina preferidos descritos en la esta memoria cumplen uno o más de las siguientes desiderata:

- 1) la  $K_i$  para la plasmina es como máximo 20 nM, preferiblemente no mayor de aproximadamente 5 nM, más preferiblemente no mayor de aproximadamente 300 pM, y lo más preferiblemente, no mayor de aproximadamente 100 pM,
- 2) el inhibidor comprende un dominio Kunitz que satisface los requisitos mostrados en la Tabla 14 con el número de los restos con referencia al BPTI,
- 3) en las posiciones del dominio Kunitz 12-21 y 32-39, uno de los tipos de aminoácidos listados para esa posición en la Tabla 15, y
- 4) el inhibidor tiene una secuencia de aminoácidos más parecida a una secuencia de referencia seleccionada del grupo de SPI11, SPI15, SPI08, SPI23, SPI51, SPI47, QS4, NS4, LACI-K2 humano, LACI-K3 humano, KuDom de a3 de colágeno humano, dominio 1 de TFPI-2 humano, dominio 2 de TFPI-2 humano, dominio 3 de TFPI-2 humano, ITI-K1 humano, ITI-K2 humano, proteasa nexina-II humana, APP-I humano, DPI-1.1.1, DPI-1.1.2, DPI-1.1.3, DPI-1.2.1, DPI-1.3.1, DPI-2.1, DPI- 3.1.1, DPI-3.2.1, DPI-3.3.1, DP1-4.1.1, DPI-4.2.1, DPI-4.2.2, DPI-4.2.3, DPI-4.2.4, DPI-4.2.5, DPI-5.1, DPI-5.2, DPI-6.1, DPI-6.2, que la secuencia de aminoácidos de dicho dominio Kunitz respecto a la secuencia del BPTI.

## NOMENCLATURA

En esta memoria, las afinidades se exponen como  $K_D$  ( $K_D(A,B) = [A][B]/[A-B]$ ). Una  $K_D$  numéricamente más pequeña refleja una afinidad mayor. Para los propósitos de esta invención, una "proteína inhibidora de plasmina" es una que se une e inhibe la plasmina con una  $K_i$  de aproximadamente 20 mM o menos. "Inhibición" se refiere a bloquear la actividad catalítica de la plasmina, y por lo tanto se puede medir en ensayos in vitro usando sustratos cromógenos o fluorógenos, o en ensayos que implican macromoléculas.

Se habla de los restos de aminoácidos de tres formas: nombre completo del aminoácido, código de referencia de tres letras, y código de referencia de una letra. Las tablas usan sólo el código de una letra. El texto usa los nombres completos y el código de tres letras cuando se requiera claridad.

A = Ala	G = Gly	M = Met	S = Ser
C = Cys	H = His	N = Asn	T = Thr
D = Asp	I = Ile	P = Pro	V = Val
E = Glu	K = Lys	Q = Gln	W = Trp
F = Phe	L = Leu	R = Arg	Y = Tyr

Para el propósito de esta invención, secuencias "**sustancialmente homólogas**" son al menos 51%, más preferiblemente al menos 80% idénticas, en cualesquiera regiones especificadas. En esta memoria, las secuencias que son idénticas se entiende que son "sustancialmente homólogas". Las secuencias todavía serían "sustancialmente homólogas" si dentro de una región de al menos 20 aminoácidos, son suficientemente similares (51% o más) pero fuera de la región de comparación son totalmente diferentes. Una inserción de un aminoácido en una secuencia respecto a la otra cuenta como un malapareamiento. Más preferiblemente, no hay más de seis restos, a parte de los extremos, que sean diferentes. Preferiblemente, la divergencia de secuencia, en particular en las regiones especificadas, es en forma de "modificaciones conservativas".

Las "**modificaciones conservativas**" se definen como

- (a) sustituciones conservativas de aminoácidos como se definen en la Tabla 9; y

(b) inserciones puntuales o múltiples o eliminaciones de aminoácidos en los extremos, en los límites de dominios, en bucles, o en otros segmentos de movilidad relativamente alta.

Preferiblemente, excepto en los extremos, no se insertan o eliminan más de aproximadamente seis aminoácidos en ningún locus, y las modificaciones están fuera de las regiones que se sabe que contienen sitios de unión importantes.

### Dominios Kunitz

En esta memoria, “dominio Kunitz” y “KuDom” se usan de forma intercambiable para significar un homólogo del BPTI (no del inhibidor de la tripsina de soja Kunitz). Un KuDom es un dominio de una proteína que tiene al menos 51 aminoácidos (y hasta aproximadamente 61 aminoácidos) que contienen al menos dos, y preferiblemente tres disulfuros. En esta memoria, los restos de todos los dominios Kunitz se numeran con referencia al BPTI (es decir, restos 1-58). Por lo tanto, el primer resto de cisteína es el resto 5 y la última cisteína es la 55. Una secuencia de aminoácidos, para el propósito de esta invención, se considerará un dominio Kunitz si se puede alinear, con tres o menos malapareamientos, con la secuencia mostrada en la Tabla 14. Una inserción o eliminación de un resto contará como un malapareamiento. En la Tabla 14, “x” empareja con cualquier aminoácido y “X” empareja con los tipos listados para esa posición. Los enlaces disulfuro unen al menos dos de: 5 a 55, 14 a 38, y 30 a 51. El número de disulfuros se puede reducir en uno, pero no se debe dejar desapareada ninguna de las cisteínas patrón. Por lo tanto, si se cambia una cisteína, entonces se añade una cisteína para compensar en una posición adecuada, o la cisteína de emparejamiento se sustituye también por un resto no cisteína (prefiriéndose en general esto último). Por ejemplo, el inhibidor de proteasa de la glándula accesoria de la *Drosophila funebris* macho no tiene cisteína en la posición 5, pero tiene una cisteína en la posición -1 (justo antes de la posición 1); se supone que ésta forma un disulfuro con la Cys<sub>55</sub>. Si se sustituyen la Cys<sub>14</sub> y Cys<sub>38</sub>, disminuyen los requisitos de Gly<sub>12</sub>, (Gly o Ser)<sub>37</sub> y Gly<sub>36</sub>. Se pueden unir a cualquiera de los extremos de un dominio Kunitz desde cero hasta muchos restos, incluyendo dominios adicionales (incluyendo otros KuDoms).

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Los inhibidores de proteasas, tales como los dominios Kunitz, funcionan mediante la unión al sitio activo de la proteasa de forma que un enlace peptídico (el “enlace escindible”): 1) no se escinde, 2) se escinde muy despacio, o 3) se escinde sin efecto porque la estructura del inhibidor impide la liberación o separación de los segmentos escindidos. En los dominios Kunitz, los enlaces disulfuro actúan para mantener la proteína junta, incluso si los enlaces peptídicos expuestos son escindidos. Desde el resto en el lado amino del enlace escindible, y moviéndose alejándose del enlace, los restos se denominan convencionalmente P1, P2, P3, etc. Los restos que siguen al enlace escindible se denominan P1', P2', P3', etc. (SCHE67, SCHE68). En general, se acepta que cada serina-proteasa tiene sitios (que comprenden varios restos) S1, S2, etc., que reciben los grupos laterales y los átomos de la cadena principal de los restos P1, P2, etc. del sustrato o inhibidor, y sitios S1', S2', etc., que reciben los grupos laterales y los átomos de la cadena principal de P1', P2', etc. del sustrato o inhibidor. Son las interacciones entre los sitios S y los grupos laterales P y átomos de la cadena principal, las que dan la especificidad de la proteasa con respecto a los sustratos y la especificidad de los inhibidores respecto a las proteasas. Debido a que el fragmento que tiene el nuevo extremo amino sale de la proteasa primero, muchos investigadores que diseñan moléculas pequeñas inhibitoras de proteasas se han concentrado en compuestos que se unen a los sitios S1, S2, S3, etc.

En LASK80 se revisan los inhibidores de proteasas proteínicos. Algunos inhibidores tienen varios sitios reactivos en una cadena de polipéptido, y estos dominios normalmente tienen secuencias, especificidades e incluso topologías diferentes. Se sabe que la sustitución de aminoácidos en la región P a P<sub>5</sub>' influye en la especificidad de un inhibidor. Previamente, se ha centrado la atención en el resto P1 y en los que están muy cerca de éste, porque estos pueden cambiar la especificidad de una clase de enzima a otra. En LASK80 se sugiere que entre los KuDoms, los inhibidores con P1 = Lys o Arg inhiben la tripsina, los que tienen P1 = Tyr, Phe, Trp, Leu y Met inhiben la quimotripsina, y los que tienen P1 = Ala o Ser es probable que inhiban la elastasa. Se continúa diciendo en LASK80, que entre los inhibidores de Kazal, los inhibidores con P1 = Leu o Met son inhibidores fuertes de la elastasa, y en la familia de Bowman-Kirk la elastasa es inhibida con P1 = Ala, pero no con P1 = Leu. Dichos cambios limitados no proporcionan inhibidores con afinidad realmente alta (es decir, mejor que 1 a 10 nM).

Los dominios Kunitz se han definido antes. Se conoce la estructura 3D (con alta resolución) del BPTI (el dominio Kutzal prototípico). Una de las estructuras de rayos X está depositada en el Brookhaven Protein Data Bank como “6PTI”. Se conocen las estructuras 3D de algunos homólogos del BPTI (EIGE90, HYNE90). Se conocen al menos setenta secuencias KuDom. Entre los homólogos humanos conocidos se incluyen tres KuDoms de LACI (WUNT88, GIRA89, NOVO89), dos KuDoms del inhibidor inter- $\alpha$ -tripsina, APPI-I (KIDO88), un KuDom de colágeno, y tres KuDoms de TFPI-2 (SPRE94).

### LACI

El inhibidor de coagulación asociado a lipoproteínas (LACI) es una fosfoglicoproteína del suero humano con un peso

molecular de 39 kDa (secuencia de aminoácidos en la Tabla 1) que contiene tres KuDoms. En lo sucesivo se denomina a la proteína LACI y a sus dominios Kunitz LACI-K1 (restos 50 a 107), LACI-K2 (restos 121 a 178), y LACI-K3 (213 a 270). La secuencia de ADNc de LACI se describe en WUNT88. En GIRA89 se describen estudios de mutaciones en los que se alteraban los restos P1 de cada uno de los tres KuDoms. LACI-K1 inhibe el Factor VIIa (F.VII), cuando F.VII forma complejo con el factor tisular y LACI-K2 inhibe el Factor X<sub>a</sub>. No se sabe si LACI-K3 inhibe algo. Ni LACI ni ninguno de los KuDoms de LACI es un inhibidor potente de plasmina.

Los KuDoms de esta invención son sustancialmente homólogos a LACI-K1, pero difieren de forma que confieren la fuerte actividad inhibidora de plasmina antes discutida. Otros KuDoms de esta invención son homólogos a otros KuDoms naturales, particularmente a otros KuDoms humanos. Para usar en seres humanos, las proteínas de esta invención se diseñan para que tengan una secuencia más parecida a un KuDom humano que al BPTI, para reducir el riesgo de producir una respuesta inmunitaria.

### Primera biblioteca de LACI-K1 y seleccionados para la unión a plasmina

Los autores de la invención han cribado en una primera biblioteca de LACI-K1 los mutantes que tienen alta afinidad por la plasmina humana, y han obtenido las secuencias mostradas en la Tabla 2 y Tabla 3. Estas secuencias se pueden resumir como se muestra en la Tabla 16, en la que los "restos preferidos" son los que aparecen en al menos una de las 32 variantes que se ha identificado que se unen a la plasmina. Las preferencias en los restos 13, 16, 17, 18 y 19 son fuertes, como se muestra en la Tabla 17. Aunque la variedad de tipos permitidos en 31 y 32 está limitada, la selección indica que se prefiere un grupo ácido en 31 y un grupo neutro en 32. En el resto 17 se prefiere Arg; la Lys, otro aminoácido positivamente cargado, no estaba en la biblioteca, y puede ser un sustituto adecuado para la Arg. Muchos tipos de aminoácidos en las posiciones 34 y 39 están de acuerdo con la unión de alta afinidad a la plasmina, pero algunos tipos pueden dificultar la unión.

Se entenderá que los autores de la invención no han secuenciado todos los aislados positivos de estas o de otras bibliotecas descritas en esta memoria, y que algunas de las proteínas posibles pueden haber estado presentes en cantidades no detectables.

Los autores de la invención han preparado una de las proteínas seleccionadas, QS4, mostrada en la tabla 2. QS4 inhibe la plasmina con una K<sub>i</sub> de aproximadamente 2 nM. Aunque este nivel de inhibición es menor que el de BPTI, QS4 es una molécula preferida para usar en seres humanos porque tiene menos potencial de inmunogenicidad. Otras proteínas mostradas en la tabla 2 y tabla 32 es muy probable que sean inhibidores potentes de la plasmina y es probable que tengan poca antigenicidad.

### Segunda biblioteca que varía los restos 10-21

Los autores de la invención han preparado una segunda biblioteca de derivados de LACI-K1 mostrados en la Tabla 5, y que permite variaciones en los restos 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, y 21. En ésta se cribó la unión a la plasmina, y se obtuvieron las proteínas mostradas en la Tabla 6.

"Consenso" en la Tabla 6 es E<sub>10</sub>TGPCRARFERW<sub>21</sub>, en el que los siete restos subrayados difieren de LACI-K1. En la posición 10 sólo se vieron aminoácidos ácidos (Glu:17 o Asp:15); Lys y Asn no son aceptables. Puesto que Glu y Asp aparecen casi con la misma frecuencia, probablemente contribuyen igual a la unión. No se vieron restos ácidos en la posición 11. La Thr era la más común (11/32), la Ser aparecía con frecuencia (9/32); la Gly aparecía 8 veces. En 13, la Pro era muy preferida (24/32) siendo segunda la Ala con 5/32. En 15, la Arg era muy preferida (25/32), pero algunos aislados (7/32) tenían Lys. Hay que indicar que BPTI(R<sub>15</sub>) es un inhibidor de plasmina peor que BPTI. En 16, la Ala era preferida (22/32), pero la Gly aparecía con bastante frecuencia (10/32). En 17, la Arg era la más común (15/32), siendo Lys la segunda (9/32). En los restos 17 y 18, APP-I tenía Met e Ile. En 18, se permitía Ile o Phe. Sólo cuatro aislados tienen Ile en 18, y ninguno de estos tiene Met en 17. Esto era sorprendente de acuerdo con KIDO88, pero bastante comprensible de acuerdo con DENN94a. Esta colección de aislados tiene una amplia distribución en 19: (Glu:8, Pro:7, Asp:4, Ala:3, His:3, Gly:2, Gln:2, Asn:1, Ser:1 y Arg:1), pero se prefieren mucho más los grupos laterales ácidos frente a los básicos. En 21, la distribución era (Trp:16, Phe:14, Leu:2, Cys:0); BPTI tiene Tyr en 21.

Se comparó la unión del fago clónicamente puro que presenta una u otra de estas proteínas, con la unión del fago de BPTI (Tabla 6). Los autores de la invención han determinado la K<sub>i</sub> de la proteína SPI11, y han encontrado que es aproximadamente 88 pM, que es sustancialmente superior a la de BPTI.

### Tercera biblioteca que varía 10-21 y 31-39

Los autores de la invención usaron una mezcla de fagos de la segunda biblioteca (variaciones en los restos 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19 y 21) que se habían seleccionado dos veces por la unión a plasmina, como fuente de ADN en la que se había introducido variegación en los restos 31, 32, 34, 35 y 39, como se muestra en la Tabla 7.

En esta biblioteca se cribó la unión a plasmina en tres ciclos, y se obtuvieron los aislados mostrados en la Tabla 8. La distribución de tipos de aminoácidos se muestra en la Tabla 18 donde “x” significa que el tipo de aminoácido no estaba permitido, y “\*” indica el tipo natural de LACI-K1.

5 Estas secuencias dieron un consenso en la región 10-21 y 31-40 de  $E_{10}TGPCRAKFDWR_{21}...E_{31}AFVYGGCGG_{40}$  (SPIcon1 en la Tabla 4). Los diez aminoácidos subrayados difieren de LACI-K1. En ocho posiciones variadas, era bastante común un segundo tipo: Asp en 10, Ala en 11, Glu en 19, Phe en 21, Thr en 31, Pro o Ser en 32, Leu o Ile en 34, y Glu en 39. En la posición 17, el inhibidor SPI11 muy potente tiene R. Por lo tanto, la secuencia  $D_{10}TGPCRARFDRF_{21}...E_{31}AFIYGGCEG_{40}$  (DPI-1.1.1 en la Tabla 4) difiere de LACI-K1 sólo en seis restos, se empareja con las secuencias seleccionadas en los restos que tienen fuerte consenso, y tiene sustituciones preferidas en las posiciones 10, 17, 21, 34 y 39. Se espera que DPI-1.1.1 tenga una afinidad muy alta por la plasmina y poco potencial de inmunogenicidad en seres humanos.

10 Los ensayos previos de la actividad inhibidora de la plasmina de las proteínas SPI11, BPTI, SPI23, SPI51, SPI47, QS4, SPI22, SPI54 y SPI43, las colocaron en el orden mostrado. SPI11 es significativamente más potente que BPTI con una  $K_i$  de aproximadamente 88 pM. SPI23 y SPI51 son muy similares en actividad y solo un poco menos potentes que BPTI. SPI47 es menos potente que SPI51 pero mejor que QS4. SPI22 es más débil que QS4. SPI54 y SPI43 no son tan potentes como QS4, con  $K_i$  probablemente  $> 4$  nM.

15 Un KuDom que es muy homólogo en los restos 5-55 respecto a cualquiera de las secuencias de SPI11, SPI15, SPI08, SPI23, SPI51, SPI47, QS4 y NS4 como se muestra en la Tabla 4, es probable que sea un inhibidor potente ( $K_D > 5$  mM) de la plasmina y tenga un bajo potencial de antigenicidad en seres humanos. Más preferiblemente, para tener una alta afinidad por la plasmina, un KuDom tendría una secuencia que sería idéntica en los restos 10-21 y 31-39 y tendría cinco o menos diferencias en los restos 5-9, 22-30 y 40-55, cuando se compara con cualquiera de las secuencias SPI11, SPI15, SPI08, SPI23, SPI51, SPI47, QS4, y NS4.

20 Usando las secuencias seleccionadas y los datos de unión de los KuDoms seleccionados y naturales, se puede escribir una receta para un KuDom inhibidor de plasmina de alta afinidad, que se puede aplicar a otros KuDom humanos parentales. Primero, el KuDom debe cumplir los requisitos de la Tabla 14. Es probable que las sustituciones mostradas en la Tabla 15 confieran actividad inhibidora de plasmina de alta afinidad en cualquier KuDom. Así, una proteína que contenga una secuencia que es un KuDom, como se muestra en la Tabla 14, y que contenga en cada una de las posiciones 12-21 y 32-39 un tipo de aminoácido mostrado en la Tabla 15 para esa posición, es probable que sea un potente inhibidor de la plasmina humana. Más preferiblemente, la proteína tendría un tipo de aminoácido mostrado en la Tabla 15 para todas las posiciones listadas en la Tabla 15. Para reducir la potencial respuesta inmunitaria, se debe usar uno u otro KuDom humano como proteína parental para dar la secuencia fuera de la región de unión.

25 Es probable que una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a SPI11 desde el resto 5 al resto 55 (como se muestra en la Tabla 4) y que es idéntica a SPI11 en las posiciones 13-19, 31, 32, 34 y 39, inhiba la plasmina humana con una  $K_i$  de 5 nM o menor. SPI11 difiere de LACI-K1 en 7 posiciones. No está claro que estas sustituciones sean igualmente importantes para fomentar la unión a la plasmina y la inhibición. Hay siete moléculas en las que una de las posiciones sustituidas de SPI11 se cambia al resto encontrado en LACI-K1 (es decir, “se invierte”), 21 en las que se invierten dos de los restos, 35 en las que se invierten tres restos, 35 en las que se invierten cuatro, 21 en las que se invierten cinco, y 7 en las que se invierten seis. Se espera que las que tienen más restos invertidos tengan menos afinidad por la plasmina, pero también menor potencial de inmunogenicidad. Un experto en la técnica puede seleccionar una proteína de suficiente potencia y baja inmunogenicidad de esta colección de 126. También es posible que las sustituciones en SPI11 por aminoácidos que difieren de LACI-K1, puedan reducir la inmunogenicidad sin reducir la afinidad por la plasmina en un grado que haga a la proteína inadecuada para usarla como un fármaco.

#### 45 INHIBIDORES DE PLASMINA DISEÑADOS KuDom

En lo sucesivo, “DPI” significará un “Inhibidor de plasmina diseñado” (por sus siglas en inglés *Designed Plasmin Inhibitor*), que son KuDoms que incorporan información de secuencias de aminoácidos de la serie de moléculas SPI, especialmente SPI11. En la Tabla 4 se dan secuencias de varios DPI y sus proteínas parentales.

50 Las secuencias DPI-1.1.1, DPI-1.1.2, DPI-1.1.3, DPI-1.1.4, DPI-1.1.5 y DPI-1.1.6 (en la Tabla 4) difieren de **LACI-K1** en los aminoácidos 6, 5, 5, 4, 3 y 2 respectivamente, y representan una serie en la que la afinidad por la plasmina puede disminuir lentamente mientras que la similitud con una secuencia humana aumenta, para reducir así la probabilidad de inmunogenicidad. Las selecciones de cada una de las bibliotecas muestran que M18F es una sustitución clave, y que I17K o I17R son muy importantes. Las selecciones de la segunda y tercera biblioteca indican que la Arg es muy preferida en 15, y que un grupo lateral ácido en 11 es desventajoso para la unión. El inhibidor SPI11 muy potente difiere del consenso en que tiene R<sub>17</sub> como BPTI. DPI-1.1.1 lleva las mutaciones D11T, K15R, I17R, M18F, K19D y E32A, y es probable que sea tan potente como un inhibidor de plasmina. DPI-1.1.2 lleva D11A, K15R, I17R, M18F y K19D, y es probable que sea muy potente. DPI-1.1.3 lleva las mutaciones D11A, K15R, I17R,

- M18F y K19D respecto a LACI-K1. DPI-1.1.3 difiere de DPI-1.1.2 en que tiene A<sub>11</sub> en lugar de T<sub>11</sub>; es probable que ambas proteínas sean inhibidores de la plasmina muy potentes. DPI-1.1.4 lleva las mutaciones I17R, M18F, K19D y E32A y debería ser bastante potente. Puesto que DPI-1.1.4 tiene menos mutaciones que SPI11, puede ser menos potente, pero también es menos probable que sea inmunógeno. DPI-1.1.5 lleva las mutaciones I17R, M18F y K19D. Es probable que esta proteína sea un buen inhibidor y es menos probable que sea inmunógena. DPI-1.1.6 lleva sólo las mutaciones I17R y M18F pero debería inhibir la plasmina.
- La proteína DPI-1.2.1 se basa en **LACI-K2** humano y se muestra en la Tabla 4. Es probable que las mutaciones P11T, I13P, Y17R, I18F, T19D, R32E, K34I, y L39E confieran una alta afinidad por la plasmina. Algunas de estas sustituciones pueden no ser necesarias, en particular P11T y T19D pueden no ser necesarias. Otras mutaciones que pueden mejorar la afinidad por la plasmina incluyen E9A, D10E, G16A, Y21W, Y21F, R32T, K34V y L39G.
- La proteína DPI-1.3.1 (Tabla 4) se basa en **LACI-K3** humano. Se pretende que las mutaciones R11T, L13P, N17R, E18F, N19D, R31E, P32E, K34I y S36G confieran una alta afinidad por la plasmina. Algunas de esas sustituciones pueden no ser necesarias, en particular N19D y P32E pueden no ser necesarias. Otros cambios que pueden mejorar K<sub>D</sub> incluyen D10E, N17K, F21W y G39E.
- La proteína DPI-2.1 (Tabla 4) se basa en el **KuDom a3 de colágeno humano**. Es probable que las mutaciones E11T, T13P, D16A, F17R, I18F, L19D, A31E, R32E y W34I confieran una alta afinidad por la plasmina. Algunas de estas sustituciones pueden no ser necesarias; en particular, L19D y A31E pueden no ser necesarias. Otras mutaciones que pueden mejorar la afinidad por la plasmina incluyen K9A, D10E, D16G, K20R, R32T, W34V y G39E.
- DPI-3.1.1 (Tabla 4) deriva del **dominio 1 de TFPI-2 humano**. Es probable que los intercambios Y11T, L17R, L18F, L19D y R31E confieran una alta afinidad por la plasmina. La mutación L19D puede no ser necesaria. Otras mutaciones que pueden favorecer la unión a la plasmina incluyen Y21W, Y21F, Q32E, L34I, L34V y E39G.
- DPI-3.2.1 (Tabla 4) deriva del **dominio 2 de TFPI-2 humano**. Este dominio parental contiene inserciones después del resto 9 (un resto) y 42 (dos restos). Es probable que las mutaciones (V<sub>9</sub>SVDDQC<sub>14</sub> sustituido por V<sub>9</sub>ETGPC<sub>14</sub>), E15R, S17K, T18F, K32T, F34V y (H<sub>39</sub>RNRIENR<sub>44</sub> sustituido por E<sub>39</sub>GNRNR<sub>44</sub>) confieran afinidad por la plasmina. Debido a la necesidad de cambiar el número de aminoácidos, DPI-3.2.1 tiene un potencial de inmunogenicidad mayor que otros KuDoms humanos modificados.
- DPI-3.3.1 (Tabla 4) deriva del **dominio 3 de TFPI-2 humano**. Es probable que las sustituciones E11T, L13P, S15R, N17R, V18F, T34I y T36G confieran una alta afinidad por la plasmina. Las mutaciones E11T, L13P y T34I pueden no ser necesarias. Otras mutaciones que pueden favorecer la unión a la plasmina incluyen D10E, T19D, Y21W y G39E.
- DPI-4.1.1 (Tabla 4) procede de **ITI-K1 humano**, por aserción de S10E, M15R, M17K, T18F, Q34V y M39G. Las mutaciones M39G y Q34V pueden no ser necesarias. Otras mutaciones que deberían favorecer la unión a la plasmina incluyen: A11T, G16A, M17R, S19D, Y21W e Y21F.
- DPI-4.2.1 (Tabla 4) procede de **ITI-K2 humano** por las mutaciones V10D, R11T, F17R, I18F y P34V. La mutación P34V puede no ser necesaria. Otras mutaciones que pueden favorecer la unión a la plasmina incluyen: V10E, Q19D, L20P, W21F, P34I y Q39E. DPI-4.2.2 es una proteína especialmente preferida puesto que sólo tiene tres mutaciones: R11T, F17R e I18F. DPI-4.2.3 es una proteína especialmente preferida puesto que sólo tiene cuatro mutaciones: R11T, F17R, I18F y L20R. DPI-4.2.4 es una proteína especialmente preferida puesto que sólo tiene cinco mutaciones: R11T, F17R, I18F, L20R y P34V. DPI-4.2.5 lleva las mutaciones V10E, R11T, F17R, I18F, L20R, V31E, L32T, P34V y Q39G, y es muy probable que inhiba la plasmina de forma muy potente. Es muy probable que cada una de las proteínas DPI-4.2.1, DPI-4.2.2, DPI-4.2.3, DPI-4.2.4 y DPI-4.2.5 sea un inhibidor muy potente de la plasmina.
- Antes del documento DENN94a, se pensaba que **APP-I** era un inhibidor de la plasmina muy potente. Por lo tanto, era sorprendente seleccionar proteínas de una biblioteca que se diseñó para permitir que los restos de APP-I en las posiciones 10-21 difirieran mucho de APP-I. Sin embargo, APP-I se puede convertir en un potente inhibidor de plasmina. DPI-5.1 se obtiene de APP-I humano (también conocido como proteasa nexina-II) por las mutaciones M17R e I18F, y es probable que sea un inhibidor de plasmina mucho mejor que el propio APP-I. DPI-5.2 lleva las mutaciones adicionales S19D, A31E y F34I, que pueden favorecer la mayor afinidad por la plasmina.
- DPI-6.1 deriva del KuDom de **HKI B9** (NORR93) por las cinco sustituciones: K11T, Q15R, T16A, M17R y M18F. Es probable que DPI-6.1 sea un potente inhibidor de plasmina. DPI-6.2 lleva las mutaciones adicionales T19D y A34V que deberían favorecer la unión a la plasmina.
- Aunque **BPTI** es el mejor KuDom natural inhibidor de plasmina conocido, se podía mejorar. DPI-7.1 deriva de BPTI por la mutación I18F que es probable que aumente la afinidad por la plasmina. DPI-7.2 lleva la mutación adicional K15R que debería aumentar la unión a la plasmina. DPI-7.3 lleva la mutación añadida R39G. DPI-7.4 lleva las mutaciones Y10D, K15R, I18F, I19D, Q31E y R39G, y debería tener una afinidad muy alta por la plasmina.

## MODIFICACIÓN DE DOMINIOS KUNITZ

Los KuDoms son bastante pequeños; si esto produjera un problema farmacológico, tal como la eliminación excesivamente rápida de la circulación, se pueden unir dos o más de dichos dominios. Un conector preferido es una secuencia de uno o más aminoácidos. Un conector preferido es uno encontrado entre los dominios repetidos de una proteína humana, en especial los conectores encontrados en homólogos de BPTI humanos, uno de los cuales tiene dos dominios (BALD85, ALBR83b) y otro de los cuales tiene tres (WUNT88). Los conectores peptídicos tiene la ventaja de que después se puede expresar la proteína entera por técnicas de ADN recombinante. También se puede usar un conector que no sea peptídico, tal como uno de los usados normalmente para formar los conjugados inmunógenos. Un medio alternativo para aumentar la permanencia en el suero de un KuDom de tipo BPTI, es unirlo al polietilenglicol, llamado PEGilación (DAV179).

## FORMAS DE MEJORAR LA ESPECIFICIDAD DE SPI11 Y OTROS INHIBIDORES DE PLASMINA KuDom

Debido a que una gran parte de la superficie del KuDom de SPI11 se ha hecho complementaria a la superficie de la plasmina, R<sub>15</sub> no es esencial para la unión específica a la plasmina. Muchas de las enzimas de las rutas de coagulación y fibrinolítica cortan preferiblemente después de Arg o Lys. No tener un resto básico en la posición P1 puede dar una mayor especificidad. La variante SPI11-R15A (mostrada en la Tabla 11) que tiene una Ala en P1, es probable que sea un buen inhibidor de plasmina y puede tener mayor especificidad por la plasmina respecto a otras proteasas, que SPI11. Es probable que la afinidad de SPI11-R15A por la plasmina sea menor que la afinidad de SPI11 por la plasmina, pero es probable que la pérdida de afinidad por otras enzimas que prefieren Arg/Lys sea mayor, y en muchas aplicaciones la especificidad es más importante que la afinidad. Otros mutantes que es probable que tengan buena afinidad y una muy alta especificidad incluyen SPI11-R15G y SPI11-R15N-E32A. Este planteamiento se podría aplicar a otros inhibidores de plasmina de alta afinidad.

## AUMENTO DE LA AFINIDAD DE SPI11

Es probable que la variación de SPI11 como se muestra en la Tabla 12 y la selección de conectores, produzca un dominio Kunitz que tenga una afinidad por la plasmina mayor que SPI11. Esta cuarta biblioteca permite la variegación del disulfuro 14-38. Se sintetizan los dos segmentos de ADN mostrados y se usan con cebadores en una reacción PCR para producir ADN<sub>bc</sub> que va de *Nsi*I a *Bst*EII. Los cebadores son idénticos a los extremos 5' de los trozos sintéticos mostrados y tienen una longitud de 21 el primero y 17 el segundo. Puesto que la variabilidad es muy grande, se procuraría obtener entre 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> transformantes (cuanto más mejor).

## MODO DE PRODUCCIÓN

Las proteínas descritas en esta memoria se pueden producir por cualquier técnica convencional, incluyendo

- a) síntesis no biológica por acoplamiento secuencial de los componentes, por ejemplo aminoácidos,
- b) producción por técnicas de ADN recombinante en células hospedantes adecuadas, y
- c) semisíntesis, por ejemplo, por eliminación de secuencias no deseadas de LACI-K1 y acoplamiento de secuencias de sustitución sintéticas.

Las proteínas descritas en esta memoria preferiblemente se producen de forma recombinante, en un hospedante adecuado, tal como bacterias de los géneros *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Erwinia*, y levaduras de los géneros *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhinosporidium*, *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*, o células de mamífero cultivadas tales como COS-1. Los hospedantes más preferidos son microorganismos de las especies *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* y *Yarrowia lipolytica*. Se puede usar cualquier promotor que sea funcional en la célula hospedante para controlar la expresión del gen.

Preferiblemente, las proteínas son secretadas, y más preferiblemente, se obtienen de medio condicionado. La secreción es la vía preferida porque es más probable que las proteínas se plieguen correctamente y se pueden producir en medio condicionado con pocos contaminantes. No se requiere secreción.

Salvo que haya una razón específica para incluir grupos glico, se prefieren proteínas diseñadas para que carezcan de sitios de glicosilación unidos a N, para reducir la posible antigenicidad de los grupos glico, y así, estas proteínas equivalentes se pueden expresar en una amplia variedad de organismos, incluyendo: 1) *E. coli*, 2) *B. subtilis*, 3) *P. pastoris*, 4) *S. cerevisiae*, y 5) células de mamífero.

Existen varios medios para disminuir el problema de las células hospedantes que producen proteasas que degradan el producto recombinante; véase, entre otros BANE90 y BANE91. En VAND92 se describe que la sobreexpresión de la peptidasa señal de *B. subtilis* en *E. coli* conduce a mayor expresión de una proteína de fusión heteróloga. ANBA88 describe que la adición de PMSF (un inhibidor de serina proteasas) al medio de cultivo mejora el rendimiento de una proteína de fusión.

Otros factores que pueden afectar a la producción de estas y otras proteínas descritas en esta memoria incluyen: 1) uso de codón (se prefiere optimizar codones para el hospedante), 2) secuencia señal, 3) secuencia de aminoácidos en los sitios de procesamiento pretendidos, presencia y localización de enzimas de procesamiento, eliminación, mutación o inhibición de diferentes enzimas que pueden alterar o degradar el producto diseñado y mutaciones que hacen al hospedante más permisivo en la secreción (se prefieren hospedantes de secreción permisiva).

Los trabajos de referencia sobre principios generales de la tecnología de ADN recombinante incluyen Watson et al., Molecular Biology of the Gene, Volumes I and II, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, CA (1987); Darnell et al., Molecular Cell Biology, Scientific American Books, Inc., New York, N.Y. (1986); Lewin, Genes II, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1985); Old, et al., Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering, 2d edition, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989); y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, NY, (1987, 1992).

### ENSAYOS DE UNIÓN A LA PLASMINA E INHIBICIÓN

Se puede usar cualquier método adecuado para ensayar los compuestos de esta invención. Scatcherd (*Ann. NY Acad. Sci.* (1949) 51:660-669) describió un método clásico para medir y analizar la unión que es aplicable a la unión de proteínas. Este método requiere la proteína relativamente pura y la capacidad de distinguir la proteína unida de la no unida.

Un segundo método adecuado para medir la  $K_D$  es medir la actividad inhibidora contra la enzima. Si la  $K_D$  que se va a medir está en el intervalo de 1 nM a 1  $\mu$ M, este método requiere sustratos cromógenos o fluorógenos y de decenas de microgramos de inhibidor relativamente puro. Para las proteínas de esta invención, que tienen una  $K_D$  en el intervalo de 5 nM a 50 pM, son suficientes de nanogramos a microgramos de inhibidor. Cuando se usa este método, la competición entre el inhibidor y el sustrato de la enzima puede dar una  $K_i$  medida que es mayor que la verdadera  $K_i$ . Las mediciones presentadas aquí no están corregidas porque la corrección sería muy pequeña, y cualquier corrección reduciría la  $K_i$ . Aquí, se usa la  $K_i$  medida como una medición directa de la  $K_D$ .

Un tercer método para determinar la afinidad de una proteína por un segundo material es tener la proteína presentada en un paquete genético, tal como M13, y medir la capacidad de la proteína para adherirse al "segundo material" inmovilizado. Este método es muy sensible porque los paquetes genéticos se pueden amplificar. Se obtienen valores al menos semicuantitativos para las constantes de unión mediante el uso de un gradiente por pasos de pH. Se usan inhibidores de afinidad conocida para la proteasa para establecer perfiles patrón contra cualesquiera otros inhibidores presentados en fagos que se consideren. Se puede usar cualquier otro método adecuado para medir la unión de proteína.

Preferiblemente, las proteínas de esta invención tienen una  $K_D$  para la plasmina como máximo de aproximadamente 5 nM, más preferiblemente como máximo de aproximadamente 300 pM, y más preferiblemente 100 pM o menos. Preferiblemente, la unión es inhibidora, de forma que  $K_i$  es la misma que  $K_D$ . La  $K_i$  de QS4 es aproximadamente 2 nM. La  $K_i$  de SPI11 para la plasmina es aproximadamente 88 pM.

### MÉTODOS Y PREPARACIONES FARMACÉUTICAS

El sujeto preferido de esta invención es un mamífero. La invención es particularmente útil en el tratamiento de seres humanos, pero también es adecuada para aplicaciones veterinarias.

En esta memoria, "protección" incluye "prevención", "supresión" y "tratamiento". "Prevención" implica la administración de fármaco antes de la inducción de la enfermedad. "Supresión" implica la administración de fármaco antes de la aparición clínica de la enfermedad. "Tratamiento" implica la administración de fármaco después de la aparición de la enfermedad.

En medicina humana y veterinaria, es posible que no se pueda distinguir entre "prevenir" y "suprimir", puesto que el(los) suceso(s) inductor(es) pueden no conocerse o estar latentes, o no se determina en el paciente hasta después de aparecer el(los) suceso(s) inductor(es). Se usa el término "profilaxis" de forma distinta a "tratamiento" para abarcar "prevenir" y "suprimir". En esta memoria, "protección" incluye "profilaxis". No es necesario que la protección sea absoluta para ser útil.

Las proteínas se pueden administrar por cualquier medio, por vía sistémica o tópica, para proteger a un sujeto frente a una enfermedad o afección adversa. Por ejemplo, la administración de dicha composición puede ser por cualquier vía parenteral, por inyección de bolo o por perfusión gradual. Alternativamente, o simultáneamente, la administración puede ser por la vía oral. Un régimen adecuado comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína, administrada como una sola dosis o como varias dosis en un periodo de horas, días, meses o años.

La dosificación adecuada de una proteína descrita en esta memoria puede depender de la edad, sexo, salud y peso

del receptor, tipo de tratamiento simultáneo, si hay alguno, frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación más preferida se puede adaptar para el sujeto individual, como puede entender y determinar un experto en la técnica, sin excesiva experimentación, ajustando la dosis de formas conocidas en la técnica.

5 Para métodos de ensayo preclínicos y clínicos de fármacos, incluyendo proteínas, véase por ejemplo, Berkow et al., eds., The Merck Manual, 15th edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1987; Goodman et al., eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th edition, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (1990); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3rd edition, ADIS Press, LTD., Williams and Wilkins, Baltimore, MD. (1987), Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston, (1985).

10 Además de una proteína descrita aquí, una composición farmacéutica puede contener vehículos, excipientes o auxiliares farmacéuticamente aceptables. Véase, por ejemplo, Berker, véase antes, Goodman, véase antes, Avery, véase antes y Ebadi, véase antes.

### MÉTODOS Y REACTIVOS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

15 Las proteínas se pueden aplicar in vitro a cualquier muestra adecuada que pueda contener plasmina, para medir la plasmina presente. Para hacer esto, el ensayo debe incluir un Sistema Productor de Señal (SPS) que proporciona una señal detectable que depende de la cantidad de plasmina presente. La señal se puede detectar de forma visual o instrumental. Entre las señales posibles se incluyen la producción de productos coloreados, fluorescentes o luminiscentes, alteración de las características de absorción o emisión de radiación por un componente o producto del ensayo, y precipitación o aglutinación de un componente o producto.

20 El componente del SPS más íntimamente asociado con el reactivo de diagnóstico se llama "marcador". Un marcador puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo, una enzima, una coenzima, un sustrato de enzima, un compuesto con densidad electrónica, o una partícula aglutinable. Un isótopo radiactivo se puede detectar usando, por ejemplo, un contador  $\gamma$  o un contador de centelleo o por autorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles son  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{32}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ , y preferiblemente,  $^{125}\text{I}$ . También se puede marcar un compuesto con un compuesto fluorescente. Cuando el compuesto con marcador fluorescente se expone a luz de la longitud de onda adecuada, se puede detectar su presencia. Entre los compuestos marcadores fluorescentes más habitualmente usados están el isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftalaldehído y fluorescamina. Alternativamente, se pueden unir metales emisores de fluorescencia, tales como  $^{125}\text{Eu}$  u otro lantánido, a la proteína de unión usando grupos quelantes de metales tales como ácido dietilentriaminapentaacético o ácido etilendiamina-tetraacético. Las proteínas también se pueden marcar de forma detectable por acoplamiento con un compuesto quimioluminiscente, tal como luminol, isolumino, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato. Igualmente se puede usar un compuesto bioluminiscente, tal como luciferina, luciferasa y acuorina para marcar las proteínas de unión. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Se prefieren marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina.

Hay dos tipos básicos de ensayos: heterogéneos y homogéneos. En los ensayos heterogéneos, la unión de la molécula de afinidad al analito no afecta al marcador; por lo tanto, para determinar la cantidad de analito, se debe separar el marcador unido del marcador libre. En los ensayos homogéneos, la interacción afecta a la actividad del marcador, y se puede medir el analito sin separación.

40 En general, se puede usar una proteína de unión a la plasmina (PBP, por sus siglas en inglés *plasmin-binding protein*) para diagnóstico de la misma forma que se usa un anticuerpo antiplasmina. Por lo tanto, dependiendo del formato de ensayo, se puede usar para ensayar plasmina, u otras sustancias que se unen a la plasmina por inhibición competitiva.

45 Normalmente, la muestra será un fluido biológico, tal como sangre, orina, linfa, semen, leche o líquido cefalorraquídeo, o uno de sus derivados, o un tejido biológico, por ejemplo, una sección u homogeneizado de tejido. La muestra puede ser cualquiera. Si la muestra es un fluido biológico o tejido, se puede coger de un ser humano u otro mamífero, vertebrado o animal, o de una planta. La muestra preferida es sangre, o una de sus fracciones o derivados.

50 En una realización, la proteína de unión a la plasmina (PBP) se inmoviliza, y se deja que la plasmina en la muestra compita con una cantidad conocida de un análogo de plasmina marcado o que se puede marcar específicamente. El "análogo de plasmina" es una molécula que puede competir con la plasmina por la unión a la PBP, que incluye la propia plasmina. Puede estar ya marcada, o se puede marcar posteriormente por unión específica del marcador a un resto, que diferencie el análogo de plasmina de la plasmina. Se separan las fases y se cuantifica el análogo de plasmina marcado en una fase.

55 En un "ensayo de tipo sándwich", se usa tanto un agente de unión a la plasmina (PBA, por sus siglas en inglés,

5 *plasmin-binding agent*) insolubilizado, como un PBA marcado. El analito de plasmina es capturado por el PBA insolubilizado y es marcado por el PBA marcado, formando un complejo terciario. Los reactivos se pueden añadir a la muestra en cualquier orden. Los PBA pueden ser iguales o diferentes, y de acuerdo con esta invención sólo es necesario que un PBA sea una PBP (el otro puede ser, por ejemplo, un anticuerpo). La cantidad de PBA marcado en el complejo terciario es directamente proporcional a la cantidad de plasmina en la muestra.

Las dos realizaciones descritas antes son ambas ensayos heterogéneos. Un ensayo homogéneo requiere que la unión de la PBP a la plasmina afecte sólo al marcador. El analito de plasmina puede actuar como su propio marcador si se usa un inhibidor de plasmina como un reactivo de diagnóstico.

10 Un marcador se puede conjugar, directa o indirectamente (por ejemplo, por un anticuerpo anti-PBP marcado), covalente (por ejemplo, con SPDP) o no covalentemente, a la proteína de unión a la plasmina, para producir un reactivo de diagnóstico. Igualmente, la proteína de unión a la plasmina se puede conjugar con un soporte en fase sólida para formar un reactivo de diagnóstico en fase sólida ("captura"). Entre los soportes adecuados se incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas y magnetita. El vehículo puede ser soluble en cierta medida o insoluble para los propósitos de esta invención. El material de soporte puede tener cualquier estructura siempre que la molécula acoplada pueda unirse a la plasmina.

### Usos de diagnóstico *in vivo*

20 Se puede usar un dominio Kunitz que se une muy fuertemente a la plasmina para generar imágenes *in vivo*. Las imágenes para el diagnóstico de focos de enfermedad se consideraron una de las mayores oportunidades comerciales de los anticuerpos monoclonales, pero esta oportunidad no se ha alcanzado. A pesar del considerable esfuerzo, sólo se han aprobado dos agentes de generación de imágenes basados en anticuerpos monoclonales. Los decepcionantes resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales, se deben en gran medida a:

- i) la inadecuada afinidad y/o especificidad;
- ii) poca penetración en los sitios objetivos;
- iii) aclaramiento lento de los sitios que no son objetivo;
- 25 iv) inmunogenicidad (la mayoría son murinos); y
- v) alto coste de producción y poca estabilidad.

30 Estas limitaciones han hecho que en el campo de la generación de imágenes de diagnóstico se empiecen a desarrollar agentes de generación de imágenes basados en péptidos. Aunque solucionan potencialmente los problemas de poca penetración y aclaramiento lento, no es probable que los agentes de generación de imágenes basados en péptidos tengan la afinidad, especificidad y estabilidad *in vivo* adecuadas para ser útiles en la mayoría de las aplicaciones.

35 Las proteínas diseñadas son excepcionalmente adecuadas para los requisitos de un agente de generación de imágenes. En particular, la extraordinaria afinidad y especificidad que se pueden obtener diseñando dominios proteínicos de origen humano, estables y pequeños, que tienen tasas de aclaramiento y mecanismos *in vivo* conocidos, se combinan para proporcionar resultados más fiables y más pronto, menos toxicidad/efectos secundarios, menor coste de producción y almacenamiento, y mayor conveniencia de la preparación del marcador. Realmente, se podría lograr el objetivo de la generación de imágenes en tiempo real con los agentes de generación de imágenes de proteínas diseñadas. Las proteínas de unión a la plasmina, por ejemplo SPI11, pueden ser útiles para localizar sitios de hemorragia interna.

40 Se puede administrar la proteína de unión radiomarcada al sujeto humano o animal. La administración típicamente es por inyección, por ejemplo, intravenosa o arterial, u otros medios de administración, en una cantidad suficiente para permitir la posterior generación de imágenes dinámica y/o estática usando dispositivos radiodetectores adecuados. La dosificación es la cantidad más pequeña capaz de proporcionar una imagen eficaz para el diagnóstico, y se puede determinar por medios convencionales en la técnica, usando agentes de generación de radioimágenes conocidos como guías.

Típicamente, la generación de imágenes se lleva a cabo en el cuerpo entero del sujeto, o en la parte del cuerpo u órgano relevante para la afección o enfermedad que se estudia. La proteína de unión radiomarcada se ha acumulado. Después, se puede cuantificar la cantidad de proteína de unión radiomarcada acumulada en un momento determinado en órganos objetivo relevantes.

50 Un dispositivo radiodetector particularmente adecuado es una cámara de centelleo, tal como una cámara  $\gamma$ . El dispositivo de detección en la cámara detecta y registra (y opcionalmente digitaliza) la desintegración radiactiva. La información digitalizada se puede analizar de cualquier forma adecuada, muchas de las cuales son conocidas en la

técnica. Por ejemplo, un análisis de tiempo-actividad puede ilustrar la absorción mediante el aclaramiento de la proteína de unión radiomarcada por los órganos objetivos con el tiempo.

Se tienen en cuenta diferentes factores para seleccionar un radioisótopo adecuado. El isótopo se selecciona: para permitir una resolución de buena calidad tras la generación de imagen, que sea seguro para usar en el uso de diagnóstico en seres humanos y animales, y preferiblemente, que tenga una semivida corta de forma que se disminuya la cantidad de radiación que recibe el cuerpo. El radioisótopo usado preferiblemente debe ser farmacológicamente inerte, y las cantidades administradas no deben tener un efecto fisiológico sustancial. La proteína de unión se puede radiomarcarse con diferentes isótopos de yodo, por ejemplo  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$  (véase por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.609.725). La cantidad de marcador se debe seguir de forma adecuada.

En las aplicaciones a sujetos humanos, puede ser conveniente usar radioisótopos distintos del  $^{125}\text{I}$  para el marcaje, para disminuir la exposición dosimétrica total del cuerpo, y optimizar la detectabilidad de la molécula marcada. Considerando la fácil disponibilidad clínica para usar en seres humanos, los radiomarcadores preferidos incluyen:  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{113\text{m}}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  o  $^{211}\text{At}$ . Se puede preparar una proteína radiomarcada por diferentes métodos. Entre estos se incluyen radiohalogenación con cloramina T o el método de la lactoperoxidasa y posterior purificación por cromatografía líquida de alta presión, por ejemplo, véase Gutkowska et al., en "Endocrinology and Metabolism Clinics of America": (1987) 16 (1):183. Se pueden usar otros métodos de radiomarcaje, tales como IODOBEADS®.

Se puede administrar una proteína radiomarcada por cualquier medio que permita al agente activo alcanzar el sitio de acción del agente en un mamífero. Debido a que las proteínas son sometidas a digestión cuando se administran por vía oral, normalmente se usará la administración parenteral, es decir, intravenosa, subcutánea, intramuscular, para optimizar la absorción.

#### Otros usos

Las proteínas de unión a la plasmina descritas en esta memoria también se pueden usar para purificar la plasmina de un fluido, por ejemplo, la sangre. Para este propósito, la PBP preferiblemente se inmoviliza en un soporte insoluble. Dichos soportes incluyen los mencionados como útiles para preparar reactivos de diagnóstico en fase sólida.

Las proteínas se pueden usar como marcadores de peso molecular como referencia en la separación o purificación de proteínas. Puede ser necesario desnaturalizar las proteínas para que sirvan como marcadores de peso molecular. Una segunda utilidad general de las proteínas es el uso de proteína hidrolizada como una fuente nutricional. Las proteínas también se pueden usar para aumentar la viscosidad de una solución.

La proteína descrita en esta memoria se puede usar para cualquiera de los propósitos anteriores, así como para propósitos terapéuticos y de diagnóstico como se discute más adelante en esta memoria descriptiva.

#### **PREPARACIÓN DE PÉPTIDOS**

La síntesis química de polipéptidos es un área que evoluciona rápidamente en la técnica, y en las siguientes referencias se describen métodos de síntesis de polipéptidos en fase sólida (Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963); Merrifield, *Science* 232:341-347 (1986); Wade et al., *Biopolymers* 25:S21-S37 (1986); Fields, *Int. J. Polypeptide Prot. Res.* 35:161 (1990); MilliGen Report Nos. 2 and 2a, Millipore Corporation, Bedford, MA, 1987) Ausubel et al., véase antes, y Sambrook et al., véase antes. Tan y Kaiser (*Biochemistry*, 1977, 16:1531-41) sintetizaron hace dieciocho años el BPTI y un homólogo.

Como se sabe en la técnica, dichos métodos implican el bloqueo o protección de grupos funcionales reactivos, tales como grupos amino, carboxilo y tio libres. Después de la formación del enlace de polipéptido, se eliminan los grupos protectores. Por lo tanto, la adición de cada resto de aminoácido requiere varias etapas de reacción para proteger y desproteger. Los métodos actuales usan la síntesis en fase sólida, en la que el aminoácido C-terminal se une covalentemente a una partícula de resina insoluble que se puede filtrar. Los reactivos se separan por lavado de las partículas de resina con disolventes adecuados usando una máquina automática. Se conocen bien en la técnica diferentes métodos, incluyendo el método del "tBoc" y el método del "Fmoc". Véase, entre otros, Atherton et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*:538-546 (1981) y Sheppard et al., *Int. J. Polypeptide Prot. Res.* 20:451-454 (1982).

#### **EJEMPLOS**

##### **Ejemplo 1: Construcción de la biblioteca de LACI (K1)**

Se clonó un dúplex de oligonucleótido sintético que tiene extremos *Nsil*- y *MluI*- compatibles, en un vector parental (LACI-K1::III) previamente escindido con las dos enzimas anteriores. El material ligado resultante se transfirió por electroporación en la cepa de *E. coli* XL1MR (F') y se cultivó en placas con ampicilina (Ap) para obtener colonias Ap<sup>R</sup> generadoras de fagos. El esquema de variegación para la Fase 1 se centra en la región P1, y afectó a los restos 13,

16, 17, 18 y 19. Permite  $6,6 \times 10^5$  secuencias de ADN diferentes ( $3,1 \times 10^5$  secuencias de proteínas diferentes). La biblioteca obtenida consistía en  $1,4 \times 10^6$  ufc independientes, que es aproximadamente una representación de dos veces la biblioteca entera. El cultivo madre de fagos generado en este cultivo en placa dio una valoración total de  $1,4 \times 10^{13}$  ufc en aproximadamente 3,9 ml, estando representado cada clon independientemente, como media,  $1 \times 10^7$  en total y  $2,6 \times 10^6$  veces por ml de cultivo madre de fagos.

Para permitir la variegación de los restos 31, 32, 34 y 39 (fase II), los dúplex de oligonucleótidos sintéticos con extremos *Mlu*I- y *Bst*EII- compatibles, se clonaron en ADN  $R_f$  previamente escindido, obtenido de uno de los siguientes:

i) la construcción parental,

ii) la biblioteca de fase I, o

iii) fago de presentación seleccionado de la primera fase, que se une a un objetivo dado.

El esquema de variegación para la fase II permite 4096 secuencias de ADN diferentes (1600 secuencias de proteínas diferentes) debido a las alteraciones en los restos 31, 32, 34 y 39. La variegación de la fase final II depende del nivel de variegación que queda después de tres ciclos de unión y elución con un objetivo dado en la fase I.

La posible variegación combinada de ambas fases es igual a  $2,7 \times 10^1$  secuencias de ADN diferentes o  $5,0 \times 10^7$  secuencias de proteínas diferentes. Cuando se usa el fago de presentación previamente seleccionado, como el origen del ADN  $R_f$  para la variegación de la fase II, probablemente el nivel de variegación final está en el intervalo de  $10^5$  a  $10^6$ .

#### **Ejemplo 2: Cribado de la unión a la plasmina en la biblioteca de LACI-K1**

El esquema para seleccionar variantes de LACI-K1 que se unen a la plasmina implica la incubación de la biblioteca de presentación en fagos con perlas de plasmina (Calbiochem, San Diego, CA; catálogo nº 527802) en un tampón (PBS que contiene BSA 1 mg/ml) antes de lavar las variantes de fagos de presentación no unidos o débilmente retenidos con PBS que contiene Tween 20 al 0,1%. Los fagos de presentación unidos más fuertemente se eluyen con un tampón de elución a pH bajo, típicamente tampón de citrato (pH 2,0) que contiene BSA 1 mg/ml, que inmediatamente se neutraliza con tampón Tris a pH 7,5. Este procedimiento constituye un sólo ciclo de selección.

El fago de presentación eluido neutralizado se puede usar:

i) para inocular una cepa  $F^+$  de *E. coli* para generar un nuevo cultivo madre de fagos de presentación, para usar en los siguientes ciclos de selección (llamada cribado convencional), o

ii) directamente para otro ciclo inmediato de selección con las perlas de proteasa (llamada cribado rápido).

Típicamente, se llevan a cabo tres ciclos de cada método, o una combinación de dos, para dar lugar al fago de presentación final seleccionado, a partir del cual se secuencian un número representativo y se analizan las propiedades de unión como mezclas de fagos de presentación o como clones individuales.

Para la biblioteca de LACI-K1, se llevaron a cabo dos fases de selección, que consistía cada una en tres ciclos de unión y elución. La selección de la fase I usó la biblioteca de Fase I (restos variegados 13, 16, 17, 18 y 19), que pasó por tres ciclos de unión y elución frente a la plasmina, dando lugar a una subpoblación de clones. El ADN  $R_f$  obtenido de esta subpoblación seleccionada se usó para generar la biblioteca de Fase II (adición de los restos variegados 31, 32, 34 y 39). Se obtuvieron aproximadamente  $5,6 \times 10^7$  transformados independientes. Las bibliotecas de Fase II experimentaron tres ciclos adicionales de unión y elución con la misma proteasa objetivo dando lugar a los seleccionados finales.

Después de las dos fases de selección frente a perlas de agarosa-plasmina, se secuenció un número representativo (16) de fagos de presentación de la selección final. La Tabla 2 muestra las secuencias de los dominios LACI-K1 seleccionados con los aminoácidos seleccionados en las posiciones variegadas en mayúsculas. Obsérvese la selección absoluta de los restos  $P_{13}$ ,  $A_{16}$ ,  $R_{17}$ ,  $F_{18}$  y  $E_{19}$ . Hay una selección muy fuerte para E en 31 y Q en 32. No hay consenso en 34; los aminoácidos observados son { $T_3$ ,  $Y_2$ ,  $H_2$ ,  $D$ ,  $R$ ,  $A$ ,  $V_2$ ,  $I_3$ , y  $L$ }. Los aminoácidos que tienen grupos laterales que se ramifican en el  $C_\beta$  ( $T$ ,  $I$  y  $V$ ) están representados múltiples veces y se prefieren. En la posición 39, no hay un alto consenso ( $G_6$ ,  $D_3$ ,  $Q_2$ ,  $A_2$ ,  $R$ ,  $F$ ,  $E$ ), pero parece que se prefieren G, D, Q y A (en este orden).

Un cribado por separado de la biblioteca de LACI-K1 frente a la plasmina dio un consenso muy similar de 16 fagos de presentación seleccionados secuenciados. Estas secuencias se muestran en la Tabla 3 (restos seleccionados en mayúsculas). Estas secuencias se desvían de las de la Tabla 2 en que aquí en la posición 19 predomina E. Hay un

consenso en 34 (T<sub>5</sub>, V<sub>3</sub>, S<sub>3</sub>, I<sub>2</sub>, L, A, F) de T, V o S. Combinando los dos grupos, hay una preferencia por (en orden de preferencia) T, V, I, S, A, H, Y y L, estando permitidos F, D y R.

### EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS CINÉTICO

5 Se volvieron a clonar los tres aislados QS4, ARFK#1 y ARFK#2 en un vector de expresión de levadura. El vector de expresión de levadura se obtiene de pMFalfa8 (KURJ82 y MIYA85). Los genes variantes de LACI se fusionaron con parte del gen *mat $\alpha$ 1*, generando un gen híbrido que consistía en el promotor de *mat $\alpha$ 1*-péptido señal y la secuencia líder fusionada con la variante de LACI. El sitio de clonación se muestra en la Tabla 24. Obsérvese que la proteína variante de LACI-K1 correctamente procesada debería ser como se detalla en la Tabla 2 y Tabla 3 con la adición de los restos glu-ala-ala-glu en la Met N-terminal (resto 1 en la Tabla 2 y Tabla 3). La expresión en *S. cerevisiae* dio un rendimiento de aproximadamente 500  $\mu$ g de inhibidor de proteasa por litro de medio. LACI (dominio Kunitz 1), BPTI y las variantes de LACI: QS4, ARFK#1 y ARFK#2 expresados en levadura, se purificaron por cromatografía de afinidad usando perlas de tripsina-agarosa.

15 El hospedante de producción más preferido es *Pichia pastoris* que utiliza el sistema de la alcohol-oxidasa. Se han producido una serie de proteínas en la levadura *Pichia pastoris*. Por ejemplo, Vedvick et al. (VEDV91) y Wagner et al. (WAGN92) produjeron aprotinina a partir del promotor de la alcohol-oxidasa con inducción por metanol, como una proteína secretada en el medio de cultivo  $\approx$  1 mg/ml. Gregg et al. (GREG93) han revisado la producción de una serie de proteínas en *P. pastoris*. La Tabla 1 de GREG93 muestra proteínas que han sido producidas en *P. pastoris* y los rendimientos.

#### Datos cinéticos

20 La inhibición de la hidrólisis de succinil-Ala-Phe-Lys-(F<sub>3</sub>Ac)AMC (una metil-cumarina) (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) por la plasmina  $2,5 \times 10^{-8}$  M con diferentes cantidades del inhibidor, se ajustó a la forma patrón para un sustrato que se une fuertemente, por mínimos cuadrados. El análisis cinético preliminar de las dos variantes ARFK demostró una actividad inhibidora muy similar a la de la variante QS4. Estas mediciones se llevaron a cabo con cantidades fisiológicas de sal (150 mM) de modo que las afinidades son importantes para la acción de las proteínas en la sangre.

25 La Tabla 23 muestra que QS4 es un inhibidor de la plasmina humana muy específico. Los fagos que presentan el derivado de LACI-K1 QS4 se unen a las perlas de plasmina al menos 50 veces más de lo que se unen otros objetivos de proteasas.

#### **NUEVA BIBLIOTECA PARA LA PLASMINA:**

30 Se hizo una nueva biblioteca de dominios LACI-K1, presentada en M13 gIIIp, y que contenía la diversidad mostrada en la Tabla 5 y se cribó la unión a la plasmina. La Tabla 6 muestra las secuencias seleccionadas y el consenso. Se caracterizó la unión de las proteínas seleccionadas comparando la unión del fago clonalmente puro a BPTI presentado en fago. Los aislados 11, 15, 08, 23 y 22 eran superiores al fago de BPTI. Se produjo SPI11 (Inhibidor de plasmina seleccionado n°11) soluble, y se ensayó su actividad inhibidora, obteniéndose una  $K_i$  de 88 pM, que es al menos dos veces mejor que la de BPTI. Por lo tanto, se cree que los seleccionados SPI15, SPI08 y SPI22 son muy superiores a BPTI y que es probable que SPI23 sea aproximadamente tan potente como BPTI. Todas las proteínas listadas están más cerca de una secuencia de aminoácidos de proteína humana de lo que lo está BPTI, y por lo tanto tienen menos posibilidad de inmunogenicidad.

TABLA 1: Secuencia de LACI entero: (SEQ ID No. 1)

5
5
5
5
5

**1** MIYTMKKVHA LWASVCLLLN LAPAPLNAds eedehtiit dtelppklM  
**51** HSFCFAKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFESLEEC  
**101** KKMCTRDnan riikttlqge kpdfCflead pgiCrgyitr yfynnqtkqC  
**151** erfkyggClg nmnnfetlee CkniCedgpn gfqvdnygtq lnavnsltp  
**201** qstkvpslfe fhgpswCltp adrglCrane nrfyynsvig kCrpkygsgC  
**251** ggnennftsk qeClraCkkg fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif  
**301** vknm

La secuencia señal (1-28) está en mayúsculas y subrayada

LACI-K1 está en mayúsculas

LACI-K2 está subrayado

LACI-K3 está en negrilla

5

TABLA 2: Secuencia de LACI-K1 y derivados que se unen a la plasmina humana

	<u>1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678</u>	
LACI-K1	mhsfcafkaddgpckaimkrffffniftrqceeflyggcegnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 2
QS1	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcEQfTyggcRgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 3
QS4	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcEQfYggcDgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 4
QS7	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcEQfHyggcDgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 5
QS8	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcEQfDyggcAgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 6
QS9	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcQEfRyggcDgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 7
QS13	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcQQfYggcQgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 8
QS15	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcEEfAyggcGgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 9
NS2	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcQQfVyggcGgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 10
NS4	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcEQfTyggcGgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 11
NS6	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcEEfTyggcGgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 12
NS9	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcEQfIyggcQgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 13
NS11	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcEQfIyggcGgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 14
NS12	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcEQfIyggcFgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 15
NS14	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcQQfHyggcEgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 16
NS15	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcEQfVyggcAgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 17
NS16	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcEQfLyggcGgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 18
ARFRCON	mhsfcafkaddgPckARFERffffniftrqcEQfIyggcGgnqnrfsleeckkmctrd	SEQ ID NO. 19

TABLA 3: Secuencia de LACI-K1 y derivados que se unen a la plasmina humana

	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	
LACI-K1	mhsfcafkaddgpckaimkrfffniftrqceeflyggcegnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 2
ARFK#1	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEQfVyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 20
ARFK#2	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEEfVyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 21
ARFK#3	mhsfcafkaddgLckGRFQRfffniftrqcEEfIyggcEgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 22
ARFK#4	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEQfTyggcMgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 23
ARFK#5	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEQfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 24
ARFK#6	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEEfLyggcLgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 25
ARFK#7	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEQfSyggcQgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 26
ARFK#8	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEQfAyggcAgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 27
ARFK#9	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEQfIyggcVgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 28
ARFK#10	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEEfSyggcKgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 29
ARFK#11	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEEfVyggcKgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 30
ARFK#12	mhsfcafkaddgPckASFERfffniftrqcEQfTyggcNgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 31
ARFK#13	mhsfcafkaddgPckASFERfffniftrqcEEfTyggcLgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 32
ARFK#14	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEQfYyggcHgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 33
ARFK#15	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEQfTyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 34
ARFK#16	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEQfTyggcMgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 35
ARFKC01	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEQfTyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 36
ARFKC02	mhsfcafkaddgPckARFERfffniftrqcEQfVyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NO. 37

Tabla 4: dominios Kunitz, algunos de los cuales inhiben la plasmina

Proteína identificada	Secuencia de aminoácidos	Afinidad K <sub>D</sub>	SEQ ID NO.
	11111111112222222222333333333344444444445555555555 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678		
QS4	mhsfcalfkaddgPckARFERffniftrqcEQFYggcDgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>2 nM</td> <td>SEQ ID NO. 4</td> </trd<>	2 nM	SEQ ID NO. 4
NS4	mhsfcalfkaddgPckARFERffniftrqcEQFTYggcGgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>(B)</td> <td>SEQ ID NO. 11</td> </trd<>	(B)	SEQ ID NO. 11
BPT1	RPDFCLEPPYTGPCKRRRIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNFKSAEDCMRTCGGA	3nM	SEQ ID NO. 38
		75 pM 225 nM	
		(KIDO88)	
APP-I humano	VREVCSEQAETGPCRAMISRWYFDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNINFDTEEYCMAVCGSA	(DENN94a)	SEQ ID NO. 39
SP111	mhsfcalfkaETgPcRAREDWffniftrqceefiyggcegnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>88 pM</td> <td>SEQ ID NO. 40</td> </trd<>	88 pM	SEQ ID NO. 40
SP115	mhsfcalfkaESgPcRARFDWffniftrqceefiyggcegnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>(A)</td> <td>SEQ ID NO. 41</td> </trd<>	(A)	SEQ ID NO. 41
SP108	mhsfcalfkaDGgPcRARFERffniftrqceefiyggcegnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>(A)</td> <td>SEQ ID NO. 42</td> </trd<>	(A)	SEQ ID NO. 42
SP123	mhsfcalfkaEGgPcRAKFRWffniftrqceefiyggcegnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>~ 0,5 nM</td> <td>SEQ ID NO. 43</td> </trd<>	~ 0,5 nM	SEQ ID NO. 43
SP122	mhsfcalfkaDGgPcKGFPRffniftrqceefiyggcegnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>&gt; 2 nM</td> <td>SEQ ID NO. 44</td> </trd<>	> 2 nM	SEQ ID NO. 44
SP1con1	mhsfcalfkaETgPcRAKEDWffniftrqcEATVYggcGgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td></td> <td>SEQ ID NO. 45</td> </trd<>		SEQ ID NO. 45
SP160	mhsfcalfkaETgPcRAKFDWffniftrqcEPVYggcEgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>(B)</td> <td>SEQ ID NO. 46</td> </trd<>	(B)	SEQ ID NO. 46
SP159	mhsfcalfkaETgPcRAKFDWffniftrqcNIVYggcGgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td></td> <td>SEQ ID NO. 47</td> </trd<>		SEQ ID NO. 47
SP142	mhsfcalfkaETgPcRGGKFDWffniftrqcQGVYggcGgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td></td> <td>SEQ ID NO. 48</td> </trd<>		SEQ ID NO. 48
SP155	mhsfcalfkaEVgPcRAKFDWffniftrqcHLTYggcGgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td></td> <td>SEQ ID NO. 49</td> </trd<>		SEQ ID NO. 49
	SPI56 mhsfcalfkaETgPcRGKFDWffniftrqcAQVYggcEgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td></td> <td>SEQ ID NO. 50</td> </trd<>		SEQ ID NO. 50
SP143	mhsfcalfkaETgPcRGKFDWffniftrqcESHYggcKgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>&gt;~4 nM</td> <td>SEQ ID NO. 51</td> </trd<>	>~4 nM	SEQ ID NO. 51
SP152	mhsfcalfkaDAGPcRAKFERffniftrqcEAFLYggcGgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td></td> <td>SEQ ID NO. 52</td> </trd<>		SEQ ID NO. 52
SP146	mhsfcalfkaDVgPcRAKFERffniftrqcEAFLYggcEgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td></td> <td>SEQ ID NO. 53</td> </trd<>		SEQ ID NO. 53
SP151	mhsfcalfkaDAGPcRAKFERffniftrqcTAFYggcGgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>~ 0,5 nM</td> <td>SEQ ID NO. 54</td> </trd<>	~ 0,5 nM	SEQ ID NO. 54
SP154	mhsfcalfkaDSgPcRARFDWffniftrqcRfPYggcGgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>&gt;~4 nM</td> <td>SEQ ID NO. 55</td> </trd<>	>~4 nM	SEQ ID NO. 55
SP149	mhsfcalfkaETgPcRAKIPILffniftrqcEPIWggcGgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td></td> <td>SEQ ID NO. 56</td> </trd<>		SEQ ID NO. 56
SP147	mhsfcalfkaDAGPcRAKFERffniftrqcEELIYggcEgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>~ 0,8 nM</td> <td>SEQ ID NO. 57</td> </trd<>	~ 0,8 nM	SEQ ID NO. 57
SP153	mhsfcalfkaETgPcKGSFDWffniftrqcNIVRYggcRgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td></td> <td>SEQ ID NO. 58</td> </trd<>		SEQ ID NO. 58
SP141	mhsfcalfkaDAGPcRARFERffniftrqcDTILYggcEgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>(AB)</td> <td>SEQ ID NO. 59</td> </trd<>	(AB)	SEQ ID NO. 59
SP157	mhsfcalfkaDSgPcKGRFGILffniftrqcTAFDWggcGgnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td></td> <td>SEQ ID NO. 60</td> </trd<>		SEQ ID NO. 60
DPI-1.1.1	mhsfcalfkadTgpcRaRFDffniftrqceAfIYggcegnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>(A)</td> <td>SEQ ID NO. 61</td> </trd<>	(A)	SEQ ID NO. 61
DPI-1.1.2	mhsfcalfkadTgpcRaRFDffniftrqceefiyggcegnqnrfsleeckkmc <trd (a)<="" td=""> <td></td> <td>SEQ ID NO. 62</td> </trd>		SEQ ID NO. 62
DPI-1.1.3	mhsfcalfkadAgpcRaRFDffniftrqceefiyggcegnqnrfsleeckkmc <trd< td=""> <td>(A)</td> <td>SEQ ID NO. 63</td> </trd<>	(A)	SEQ ID NO. 63



(continuación)

Proteína identificada	Secuencia de aminoácidos	Afinidad K <sub>D</sub>	SEQ ID NO.
	11111111112222222222333333333344444444445555555555 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678		
DPI-6.1	lpnvcafpmeTgpcRARFtrwffnftgeceelfayggcggnsmnfirkeckekfckft		SEQ ID NO. 125
DPI-6.2	lpnvcafpmeTgpcRARFDnwffnftgeceelfyggcggnsmnfirkeckekfckft		SEQ ID NO. 126
DPI-4.2.2	tvaacnlpivTgpcraRFqlwatdavkgkcvlfpvggcqngnkfysekecreycgvp		SEQ ID NO. 130
DPI-4.2.3	tvaacnlpivTgpcraRFqRwafdavkgkcvlfpvggcqngnkfysekecreycgvp		SEQ ID NO. 131
DPI-4.2.4	tvaacnlpivTgpcraRFqRwafdavkgkcvlfpvggcqngnkfysekecreycgvp		SEQ ID NO. 132
DPI-4.2.5	tvaacnlpivTgpcraRDRwafdavkgkcvlfpvggcGgngnkfysekecreycgvp		SEQ ID NO. 133
DPI-7.1	rpdfcleppytpckarFiryfynakaglcqtfvyggcrakrnfkksaedcmrtcgga		SEQ ID NO. 134
DPI-7.2	rpdfcleppytpcRarFiryfynakaglcqtfvyggcrakrnfkksaedcmrtcgga		SEQ ID NO. 135
DPI-7.3	rpdfcleppytpcRarFiryfynakaglcqtfvyggcGakrnfkksaedcmrtcgga		SEQ ID NO. 136
DPI-7.4	rpdfcleppDltpcRarFDryfynakaglcEtrvyggcGakrnfkksaedcmrtcgga		SEQ ID NO. 137

En "Afinidad", "(A)" significa que es probable que la K<sub>D</sub> sea menor que la de BPTI (es decir 300 pM), "(B)" significa que es probable que la K<sub>D</sub> sea menor que 2 nM, y "(C)" significa que es probable que la K<sub>D</sub> sea menor que 20 nM.



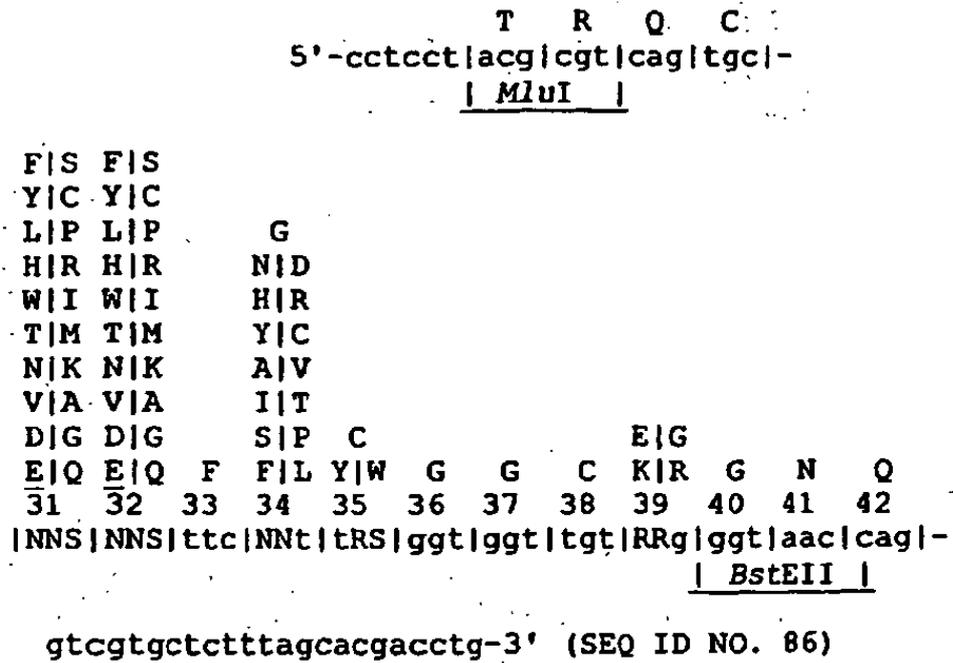
**Tabla 6:** derivados de LACI-K1 seleccionados para la unión a la plasmina

Ident	1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1	DIFS	Unión de fago	K <sub>D</sub> (pM)	SEQ ID NO.
Consenso	E T G P C R A R F E R W	0			SEQ ID NO. 88
LACIK1	d d g p c k a i m k r f	7			SEQ ID NO. 2
SPI31	-----G--	1			SEQ ID NO. 89
SPI11	-----D--	1	3,2X	88	SEQ ID NO. 40
SPI15	-S-----D--	2	2,5X		SEQ ID NO. 90
SPI24	D-----G----L	3			SEQ ID NO. 91
SPI33	---S--G--D--	3			SEQ ID NO. 92
SPI34	-V-----5-P--	3			SEQ ID NO. 93
SPI26	-----T-P-F	3			SEQ ID NO. 94
SPI37	-V-----s-H--	3			SEQ ID NO. 95
SPI32	D-----S-G--	3			SEQ ID NO. 96
SPI12	-----GM-P--	3			SEQ ID NO. 97
SPI36	-G-----N-F	3			SEQ ID NO. 98
SPI08	DG-----F	3	2,6X		SEQ ID NO. 42
SPI36	-----IS-F	3			SEQ ID NO. 99
SPI18	-G-----K---F	3			SEQ ID NO. 100
SPI23	-G-----K-Q--	3	1,25X		SEQ ID NO. 43
SPI35	DS-A--G-----	4			SEQ ID NO. 101
SPI02	DS----G----F	4	0,83X		SEQ ID NO. 102
SPI25	D-----S-P-L-	4			SEQ ID NO. 103
SPI17	-V-----IQ-F	4	0,09X		SEQ ID NO. 104
SPI05	-S-----K-A-F	4	0,69.X		SEQ ID NO. 105
SPI13	-G-----K-A-F	4			SEQ ID NO. 106
SPI07	D--S---KI---	4			SEQ ID NO. 107
SPI03	DS---K---D--		4 0,48 X		SEQ ID NO. 108
SPI06	DG---KG-----	4			SEQ ID NO. 109
SPI16	-V-A-KG--H--	5	0,22 X		SEQ ID NO. 110
SPI04	DG-----S-P-F	5			SEQ ID NO. 111
SPI01	DS-A---M-H-F	6	0,25 X		SEQ ID NO. 112
SPI14	DS-A---K-R--	5			SEQ ID NO. 113
SPI28	DS-T-K---P-F	6			SEQ ID NO. 114
SPI27	-----KGKIA-F	6			SEQ ID NO. 115
SPI21	DS-A-KGK-----	6	0,38 X		SEQ ID NO. 116
SPI22	DG---KGK-P-F	7	2,0 X		SEQ ID NO. 44

"Difs" es el número de diferencias respecto al Consenso.

"Unión del fago" es la unión del fago que presenta la proteína designada respecto a la unión del fago que presenta BPTI.

Tabla 7: Variación de los restos 31, 32, 34 y 39



La secuencia de aminoácidos tiene el SEQ ID NO. 87

5 Se elimina el sitio *EcoRI*; por lo tanto, se puede usar la escisión con *EcoRI* para eliminar (o reducir al menos mucho) el ADN parental.

Hay 262.144 secuencias de ADN y 72.000 secuencias de proteínas.

**Tabla 8:** Seleccionados por la unión a la plasmina con variegación en el segundo bucle

Id	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 3 3 3 3 3 3 3	n°1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	Difs C1 C K1		
	3 3 3 4 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1				
Con1	E T g P c R A K F D r W	E A f V Y g g c G g		10	SEQ ID NO. 45
SPI47	D A ----- E - F	- E - I ----- E -	7 (5)	5	SEQ ID NO. 57
SPI51	DA ----- E - F	T -- F ----- 6	(4)	9	SEQ ID NO. 54
SPI52	DA ----- E - F ---	L ----- 5	(3)	8	SEQ ID NO. 52
SPI46	DV ----- E -	F --- L ---- E - 6	(3)	7	SEQ ID NO. 53
SPI41	D A ----- R - E - F	D T - L ---- E - 9	(6)	8	SEQ ID NO. 59
SPI42	----- G -----	Q G ----- 3	(3)	12	SEQ ID NO. 48
SPI43	----- G -----	- S - H ---- K - 4	(4)	11	SEQ ID NO. 51
SPI56	----- G -----	A Q ----- E - 4	(3)	11	SEQ ID NO. 50
SPI59	-----	N T ----- 2	(2)	11	SEQ ID NO. 47
SPI60	-----	- P ----- E - 2	(1)	9	SEQ ID NO. 46
SPI55 -	V -----	H L - T ----- 4	(4)	11	SEQ ID NO. 49
SPI49	----- I P - L	- P - I W -----	(6)	10	SEQ ID NO. 56
SPI57	D S --- K G R - G - L	T -- D W ----- 10	(8)	11	SEQ ID NO. 60
SPI53	----- K G S -----	N V - R ---- R - 7	(7)	11	SEQ ID NO. 58
SPI54	D S ----- R ----	T R - P ----- 6	(4)	10	SEQ ID NO. 55
SPI11	----- R ----	e e f i y g g c e g [1] (4)		7	SEQ ID NO. 40
LACI1	d d g p c k a i m k r f	e e f i y g g c e g 10	(7)	0	SEQ ID NO. 2

Véanse las siguientes notas

En la Tabla “-” significa que las proteínas tienen el tipo de consenso (Con1). Con 1 contiene el tipo más común en cada posición; los aminoácidos mostrados en Con1 no se variaron. Cuatro posiciones (10, 31, 34 y 39) mostraron significativa tolerancia por un segundo tipo, conduciendo a 15 secuencias consenso secundarias: Con2-Con16. La columna “n° Difs” muestra el número de diferencias con CON1 en “C1”, las diferencias con el más cercano de Con1-Con16 en “C”, y las diferencias con LACI-K1 en “K1”. SPI11 se seleccionó de una biblioteca en la que los restos 31-39 se bloquearon en el tipo salvaje.

SPI11  
Muy superior

<BPTI<SPI23 = SPI51 <SPI47  
muy potente

<QS4<SPI22<SPI54<SPI43  
potente

**Tabla 9: Sustituciones conservativas y semiconservativas**

Tipo de AA inicial	Categoría	Sustituciones conservativas	Sustitución semiconservativa
A	Pequeño no polar o ligeramente polar	G, S, T	N, V, P, (C)
C	Disulfuro SH libre	A, M, L, V, I ninguna	F, G ninguna
D	ácido, hidrófilo	E, N, S, T, Q	K, R, H, A
E	ácido, hidrófilo	D, Q, S, T, N	K, R, H, A
F	aromático Gly-sólo conformación "normal"	W, Y, H, L, M ninguna	I, V, (C) ninguna
G	conformación	A, S, N, T	D, E, H, I, K, L, M, Q, R, V
H	aromático anfótero	Y, F, K, R	L, M, A, (C)
I	alifático, carbono β ramificado	V, L, M, A	F, Y, W, G (C)
K	básico	R, H	Q, N, S, T, D, E, A
L	alifático	M, I, V, A	F, Y, W, H, (C)
M	hidrófobo	L, I, V, A	Q, F, Y, W, (C), (R), (K), (E)
N	hidrófilo no polar	S, T, (D), Q, A, G, (E)	K, R
P	inflexible	V, I	A, (C), (D), (E), F, H, (K), L, M, N, Q, (R), S, T, W, Y
Q	alifático más amida	N, E, A, S, T, D	M, L, K, R
R	básico	K, Q, H	S, T, E, D, A,
S	hidrófilo	A, T, G, N	D, E, R, K
T	hidrófilo alifático,	A, S, G, N, V, I, L, M, A, T	D, E, R, K, I P, (C)
V	carbono β ramificado		
W	aromático	F, Y, H	L, M, I, V, (C)
Y	aromático	F, W, H	L, M, I, V, (C)

El cambio de A, F, H, I, L, M, P, V, W o de Y a C, es semiconservativo, si la nueva cisteína permanece como un tiol libre.

- 5 El cambio de M a E, R, K es semiconservativo si el extremo iónico del nuevo grupo lateral puede alcanzar la superficie de la proteína, mientras que los grupos metileno hacen contactos hidrófobos.

El cambio de P a uno de K, R, E o D es semiconservativo si el grupo lateral está en o cerca de la superficie de la proteína.

**Tabla 10: Derivados del dominio Kunitz de LACI-K1 inhibidores de plasmina**

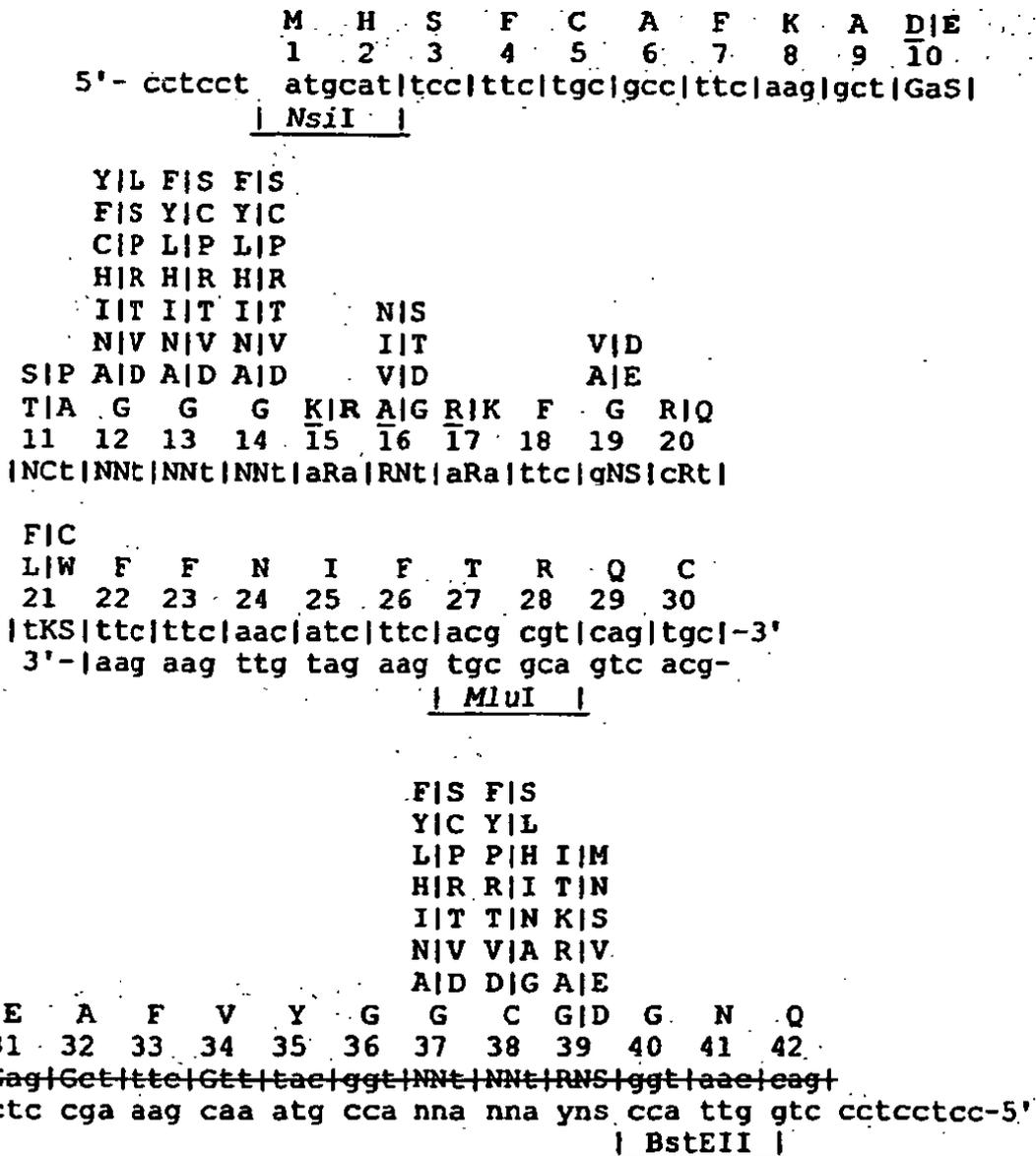
Posición	Consenso nº 1		Consenso nº 2		Consenso nº 3		Consenso nº 4	
	Tipo	Estado	Tipo	Estado	Tipo	Estado	Tipo	Estado
10	D	fijo	D	fijo	E/D	S-S	D/E	S-S
11	D	fijo	D	fijo	T/S	G-S	T/A	G-S
12	G	fijo	G	fijo	G	fijo	G	fijo
13	P	Abs-S	P	VS-S	P	VS-S	P	Abs-S
14	C	fijo	C	fijo	C	fijo	C	fijo
15	K	fijo	K	fijo	R	S-S	R	S-S
16	A	Abs-S	A	Abs-S	A	VS-S	A	S-S
17	R	Abs-S	R	VS-S	R/K	S-S	K	S-S
18	F	Abs-S	F	Abs-S	F	VS-S	F	VS-S
19	E	Abs-S	E	Abs-S	-E/P/ D	S-S	D/E	VS-S
20	R	fijo	R	fijo	R	fijo	R	fijo
21	F	fijo	F	fijo	W/F	Sel-débil	W/F	Sel-débil
31	E	S-S	E	S-S	E	fijo	E/t	G-S
32	Q	G-S	Q	G-S	E	fijo	A/T	Fuerte para tipo sin carga, débil para
33	F	fijo	F	fijo	F	fijo	F	fijo
34	-	no consenso	T/S	débil	I	fijo	V/L/	débil
35	Y	fijo	Y	fijo	Y	fijo	Y	S-S
39	-	no consenso	G	Sel-débil	E	fijo	G/E	Sel- algo

Abs-S Selección absoluta S-S selección fuerte  
VS-S Selección muy fuerte G-S Buena selección

Tabla 11: Inhibidores de plasmina diseñados con alta especificidad

	Secuencia	
	11111111112222222222333333333344444444445555555555	
Ident	123456789012345678901234567890123456789012345678	SEQ ID NO.
SPI11	mhsfcafkaETgPcRARFDrWffniftrqceefiyggcegnqnrfesleeckmctrd	SEQ ID NO. 40
Spl11-R15A	mhsfcafkaETgPcAARFDrWffniftrqceefiyggcegnqnrfesleeckmctrd	SEQ ID NO. 117
Spl11-R15G	mhsfcafkaETgPcGARFDrWffniftrqceefiyggcegnqnrfesleeckmctrd	SEQ ID NO. 118
SPI11-R15N-E32A	mhsfcafkaETgPcNARFDrWffniftrqceAfiyggcegnqnrfesleeckmctrd	SEQ ID NO 117

Tabla 12: ADNvg para LACI-D1 para variar los restos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 37, 38 y 39 para la plasmina teniendo en cuenta App-I y SPI11



5

La primera (superior) cadena de ADN tiene el SEQ ID NO. 120.

La segunda (inferior) cadena de ADN tiene el SEQ ID NO. 121.

# ES 2 375 561 T3

La secuencia de aminoácidos tiene el SEQ ID NO. 122.

No es necesario sintetizar la cadena de los codones 31-42 (mostrada), pero se produce por la PCR a partir de las cadenas mostradas.

Hay  $1,37 \times 10^{11}$  secuencias de ADN que codifican  $4,66 \times 10^{10}$  secuencias de aminoácidos.

5 **Tabla 14: Definición de un dominio Kunitz (SEQ ID NO. 123)**

```

1 2 3 4 5
123456789012345678901234567890123456789012345678
xxxxCxxxxxxxxGxCxxxxxxxxXXXXXXXXXXCxxFXXGCxXxxXxXXXXXXXXCxxxCxxx
    
```

En el que:

*X1, X2, X3, X4, X58, X57 y X56 pueden estar ausentes*

X21 = Phe, Tyr, Trp,

10 X22 = Tyr o Phe,

X23 = Tyr o Phe,

X35 = Tyr o Trp,

X36 = Gly o Ser,

X40 = Gly o Ala,

15 X43 = Asn o Gly, y

X45 = Phe o Tyr

**Tabla 15: Sustituciones para conferir a los KuDoms alta afinidad por la plasmina**

Posición	Tipos permitidos	Posición	Tipos permitidos
10	<b>Asp, Glu,</b> Tyr	20	<b>Arg</b>
11	<b>Thr, Ala, Ser,</b> Val, Asp	21	<b>Phe, Trp,</b> Tyr
12	<b>Gly</b>	31	<b>Asp, Glu, Thr, Val, Gin, Ala</b>
13	Pro, Leu, Ala	32	<b>Thr, Ala, Glu,</b> Pro, Gln
14	Cys	34	<b>Val, Ile, Thr, Leu, Phe, Tyr, His, Asp, Ala, Ser</b>
15	Arg, Lys	35	<b>Tyr, Trp</b>
16	Ala, Gly	36	<b>Gly</b>
17	<b>Arg,</b> Lys, Ser	37	<b>Gly</b>
18	<b>Phe,</b> Ile	38	<b>Cys</b>
19	<b>Glu, Asp,</b> Pro, Gly, Ser, Ile	39	<b>Glu, Gly, Asp, Arg, Ala, Gln, Leu, Lys, Met</b>

En la Tabla 15, se prefieren los restos en negrilla.

**Tabla 16: Sumario de secuencias seleccionadas de la primera biblioteca de LACI-K1 para la unión a la plasmina**

BPTI nº (tipo de BPTI)	(LACI-K1)	Restos permitidos en la biblioteca	Restos preferidos
13 (P)	P	LHPR	PL
16 (A)	A	AG	AG
17 (R)	I	FYLIENA SCPRTVD G	RS
18 (I)	M	todos	F
19 (I)	K	LWQMKAG SPRTVE	EQ
31 (Q)	E EQ		EQ
32 (T)	E	EQ	QE
34 (V)	I	todos	TYHRAVELSF
39 (R)	E	todos	GADRQFEMLVKNH

**Tabla 17: Distribución de secuencias seleccionadas de la primera biblioteca:**

Posición	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
13	x	x	x	x	x	x	0	x	x	1	x	x	31	x	0	x	x	x	x	x
16	31	x	x	x	x	1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
17	0	0	0	x	0	0	0	0*	x	0	x	0	0	x	30	2	0	0	x	0
18	0	0	0	0	32	0	0	0	0	0	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	x	x	31	x	0	x	x	0*	0	0	x	0	1	0	0	0	0	0	x
31	x	x	x	28	x	x	x	x	x	x	x	x	x	4	x	x	x	x	x	x
32	x	x	x	9*	x	x	x	x	x	x	x	x	x	23	x	x	x	x	x	x
34	2	0	1	0	1	0	2	5*	0	2	0	0	0	0	1	3	8	5	0	2
39	3	0	3	2*	1	10	1	0	2	2	2	1	0	3	1	0	0	1	0	0

5

Tabla 18: Distribución de tipos de aminoácidos en distintos restos, en proteínas seleccionadas para la unión a la plasmina de la tercera biblioteca.

Posición	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
10	x	x	7*	8	x	x	x	x	0	x	x	0	x	x	x	x	x	x	x	x
11	4	x	0*	x	x	0	x	0	x	x	x	0	x	x	x	2	7	2	x	x
13	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	15*	x	x	0	0	x	x	x
15	x	x	x	x	x	x	x	x	2*	x	x	x	x	x	13	x	x	x	x	x
16	10*	x	x	x	x	5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
17	x	x	x	x	x	x	x	0*	11	x	0	0	x	x	3	1	0	x	x	x
18	x	x	x	x	14	x	x	1	x	x	x*	x	x	x	x	x	x	x	x	x
19	0	0	8	5	0	1	0	0	0*	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
21	x	0	x	x	5*	x	x	x	x	2	x	x	x	x	x	x	x	x	8	x
31	1	0	1	6*	0	0	1	0	0	0	0	2	0	1	0	0	3	0	0	0
32	4	0	0	1*	0	1	0	0	0	1	0	0	2	1	1	1	2	1	0	0
34	0	0	1	x	1	0	1	2*	x	3	x	0	1	x	1	0	1	4	x	0
35	x	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	2	13*
39	x	x	x	5*	x	8	x	x	1	x	x	x	x	x	1	x	x	x	x	x

Tabla 23: Resultados de especificidad obtenidos con KuDoms presentados en gIIIp de M13 objetivo.

KuDom presentado	Plasmina	Trombina	Calicreína	Tripsina	Tripsina, 2 lavados
LACI-K1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
QS4	52	0,7	0,9	4,5	0,5
BPTI	88	1,1	1,7	0,3	0,8

5 El fago con LACI-K1 para cada objetivo se consideró como unión unitaria, y los otros fagos de presentación se muestran como de unión relativa. BPTI::fago III no es liberado fácilmente de la tripsina.

Tabla 24: vectores de expresión de *S. cerevisiae* Mat a

Mat $\alpha$ 1 (Mf $\alpha$ 8)

K R P R  
 5' - ... | AAA | AGG | CCT | CGA | G... - 3'  
           | StuI |  
                   | XhoI |

Mat $\alpha$ 2 (después de introducir un conector en el corte del ADN *StuI*)

K R E A A E P W G A . . . L E  
 5' | AAA | AGG | GAA | GCG | GCC | GAG | CCA | TGG | GGC | GCC | TAA | TAG | CTC | GAG | 3'  
           | EagI | | StyI | KasI | | XhoI |

Mat $\alpha$ -LACI-K1

a b c d 1 2 3 4 5 6 7 8  
 K R E A A E M H S F C A F K  
 5' | AAA | AGG | GAA | GCG | GCC | GAG | atg | cat | tcc | ttc | tgc | gct | ttc | aaa |  
           | EagI | | NsiI |

9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20  
 A D D G P C K A I M K R  
 | gct | gat | gaC | ggT | ccG | tgt | aaa | gct | atc | atg | aaa | cgt |  
           | RsrII | | BspHI |

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30  
 F F F N I F T R Q C  
 | ttc | ttc | ttc | aac | att | ttc | acG | cgt | cag | tgc |  
           | MluI |

31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42  
 E E F I Y G G C E G N Q  
 | gag | gaA | ttC | att | tac | ggt | ggt | tgt | gaa | ggt | aac | cag |  
           | EcoRI | | BstEII |

43 44 45 46 47 48 49 50  
 N R F E S L E E  
 |aac | cgG | ttc | gaa | tct | ctA | gag | gaa |  
           | | BstBI | | XbaI |  
           | AgeI |

51 52 53 54 55 56 57 58 59 60  
 C K K M C T R D G A  
 | tgt | aag | aag | atg | tgc | act | cgt | gac | ggc | gcc | TAA | TAG | CTC | GAG | - 3'  
           | KasI | | XhoI |

5 La solicitante espera que la secuencia previa a Mat $\alpha$  se escinda antes de GLU<sub>a</sub>-ALA<sub>b</sub>-

CITAS

ADEL86: Adelman et al., *Blood* (1986) 68(6)1280-1284.

ANBA88: Anba et al., *Biochimie* (1988) 70(6)727-733.

AUER88: Auerswald et al., *Bio Chem. Hoppe-Seyler* (1988), 369(Supplement):27-35.

- BANE90: Baneyx & Georgiou, *J. Bacteriol.* (1990)172(1)491-494.
- Bank91: Baneyx & Georgiou, *J. Bacteriol.* (1991) 173(8)2696-2703.
- BROW91: Browne et al., entrada en *GeneBank* M74220.
- BROZ90: Broze et al., *Biochemistry* (1990) 29:7539-7546.
- 5 Cold87: Colman et al., Editors, Hemostasis and Thrombosis, Second-Edition, 1987, J. B. Lippincott Company, Filadelfia, PA.
- DENN94a: Dennis & Lazarus, *J. Biological Chem.* (1994) 269:22129-22136.
- DENN94b: Dennis & Lazarus, *J. Biological Chem.* (1994) 269:22137-22144.
- EIGE90: Eigenbrot et al., *Protein Engineering* (1990), 3(7)591-598.
- 10 ELLI92: Ellis et al., *Ann. N Y Acad. Sci.* (1992) 667:13-31.
- FIDL94: Fidler & Ellis, *Cell* (1994) 79:185-188.
- FRAE89: Fraedrich et al., *Thorac. Cardiovasc. Surg.* (1989) 37(2)89-91.
- GARD93: Gardell, *Toxicol. Pathol.* (1993) 21(2)190-8.
- GIRA89: Girard et al., *Nature* (1989), 338:518-20.
- 15 GIRA91: Girard et al., *J. BIOL. CHEM.* (1991) 266:5036-5041.
- GREG93: Gregg et al., *Bio/Technology* (1993) 11:905-910.
- HOOV93: Hoover et al., *Biochemistry* (1993) 32:10936-43.
- HYNE90: Hynes et al., *Biochemistry* (1990), 29:10018-10022.
- KIDO88: Kido et al., *J. Biol. Chem.* (1988), 263:18104-7.
- 20 KID090: Kido et al., *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* (1990), 167(2)716-21.
- KURJ82: Kurjan and Herskowitz, *Cell* (1982) 30:933-9.43.
- LASK80: Laskowski & Kato, *Ann. Rev. Biochem.* (1980), 49:593-626.
- LEAT91: Leatherbarrow & Salacinski, *Biochemistry* (1991) 30(44)10717-21.
- LOHM93: Lohmann & J Marshall, *Refract. Corneal Surg.* (1993) 9(4)300-2.
- 25 LUCA83: Lucas et al., *J. Biological Chem.* (1983) 258(7)4249-56.
- MANN87: Mann & Foster, Capítulo 10 de COLM87.
- MIYA85: Miyajima et al., *Gene* (1985) 37:155-161.
- NEUH89: Neuhaus et al., *Lancet* (1989) 2(8668)924-5.
- NOVO89: Novotny et al., *J. BIOL. CHEM.* (1989) 264:18832-18837.
- 30 OREI94: O'Reilly et al., *Cell* (1994) 79:315-328.
- PARK86: Park & Tulinsky, *Biochemistry* (1986) 25(14)3977-3982.
- PUTT89: Putterman, *Acta Chir Scand.* (1989) 155(6-7)367.
- ROBB87: Robbins, Capítulo 21 de COLM87
- SCHE67: Schechter & Berger. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1967) 27:157-162.
- 35 SCHE68: Schechter & Berger. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1968) 32:898-902.
- SCHN86: Schnabel et al., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* (1986), 367:1167-76.

- SHER89: Sheridan et al., *Dis. Colon Rectum* (1989) 32(6)505-8.  
 SPRE94: Sprecher et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3353-3357 (1994)  
 VAND92: van Dijn et al., *EMBO J.* (1992) 11(8)2819-2828.  
 VARA83: Varadi & Patthy, *Biochemistry* (1983) 22:2440-2446.  
 5 VARA84: Varadi & Patthy, *Biochemistry* (1984) 23:2108-2112.  
 VEDV91: Vedvick et al., *J. Ind. Microbiol.* (1991) 7:197-201.  
 WAGN92: Wagner et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1992) 186:1138-1145.  
 WUNT88: Wun et al., *J. BIOL. CHEM.* (1988) 263:6001-6004.

Las siguientes páginas contienen realizaciones preferidas.

10 Realizaciones

1. Una proteína inhibidora de plasmina que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a los restos 5 a 55 de una secuencia de referencia seleccionada del grupo que comprende SPI11, SPI15, SPI08, SPI23, SPI51, SPI47, QS4, y NS4, mostradas en la tabla 4.
- 15 2. Una proteína como en la realización 1, en la que la secuencia es idéntica en los restos 10-21 y 31-39 y tiene 5 o menos diferencias en los restos 5-9, 22-30 y 40-55 comparada con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que comprende SPI11, SPI15, SPI08, SPI23, SPI51, SPI47, QS4, y NS4, mostradas en la tabla 4.
- 20 3. Una proteína inhibidora de plasmina en la que dicha proteína comprende un dominio Kunitz que cumple los requisitos mostrados en la tabla 14 con los números de los restos con respecto al BPTI, y en la que dicha proteína tiene en las posiciones del dominio Kunitz 12-21 y 32-39 uno de los tipos de aminoácidos listados para esa posición en la tabla 15, y en la que la secuencia de dicho dominio Kunitz es más similar en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de referencia seleccionada del grupo de SPI11, SPI15, SPI08, SPI23, SPI51, SPI47, QS4, NS4, LACI-K2 humano, LACI-K3 humano, KuDom de  $\alpha 3$  de colágeno humano, dominio 1 de TFPI-2 humano, dominio 2 de TFPI-2 humano, dominio 3 de TFPI-2 humano, ITI-KI humano, ITI-K2 humano, PROTEASA NEXINA-II humana, APP-I humano, DPI-1.1.1, DPI-1.1.2, DPI-1.1.3, DPI-1.2.1, DPI-1.3.1, DPI-2.1, DPI-3.1.1, DPI-3.2.1, DPI-3.3.1, DPI-4.1.1, DPI-4.2.1, DPI-4.2.2, DPI-4.2.3, DPI-4.2.4, DPI-4.2.5, DPI-5.1, DPI-5.2, DPI-6.1 y DPI-6.2 que la secuencia de aminoácidos de dicho dominio Kunitz a la secuencia del BPTI.
- 25 4. Una proteína como en la realización 3, en la que el resto 18 es Phe, el resto 15 es Arg, el resto 16 es Ala y el resto 17 es Arg.
- 30 5. Una proteína como en la realización 1 o realización 3, en la que dicha proteína tiene una  $K_i$  para la plasmina humana de 100 pM o menos.
6. Un método para prevenir o tratar un trastorno atribuible a una actividad excesiva de la plasmina, que comprende administrar a un sujeto humano o animal que se beneficiaría de la misma, una cantidad inhibidora de plasmina de la proteína de la realización 1 o realización 3.
- 35 7. Un método de ensayo de la plasmina que comprende proporcionar la proteína de la realización 1 o realización 3 en forma marcada o insolubilizada, y determinar si en una muestra se forma un complejo de dicha proteína y la plasmina.
8. Un método para purificar la plasmina de una mezcla, que comprende poner en contacto la mezcla con la proteína o análogo de la realización 1 o realización 3 en forma insolubilizada, y dejar que se una la plasmina.
- 40 9. Una proteína como en la realización 3, en la que el dominio Kunitz parental es de origen humano y la proteína inhibe la plasmina humana con una  $K_i$  de aproximadamente 300 pM o menos.
10. Una proteína como en la realización 3, en la que la proteína tiene en cada una de las posiciones listadas en la tabla 15 un tipo de aminoácido mostrado para esa posición en la tabla 15.
11. Una proteína inhibidora de plasmina que tiene una  $K_i$  de aproximadamente 100 pM o menos.

**REIVINDICACIONES**

1.- Uso de un polipéptido inhibidor de plasmina aislado que comprende una estructura de dominio Kunitz, que comprende una secuencia de aminoácido que tiene la fórmula

5 Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Cys-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Gly-Xaa13-Cys-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Arg-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, en la que

cualquiera de Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 o Xaa58 puede estar ausente;

Xaa10 se selecciona de Asp y Glu;

10 Xaa11 se selecciona de Thr, Ala y Ser;

Xaa13 es Pro;

Xaa15 es Arg;

Xaa16 es Ala;

Xaa17 es Arg;

15 Xaa18 es Phe;

Xaa19 se selecciona de Glu y Asp;

Xaa21 se selecciona de Phe y Trp;

Xaa22 se selecciona de Tyr y Phe;

Xaa23 se selecciona de Tyr y Phe;

20 Xaa31 se selecciona de Asp y Glu;

Xaa32 se selecciona de Thr, Ala y Glu;

Xaa34 se selecciona de Val, Ile y Thr;

Xaa35 es Tyr;

Xaa36 es Gly;

25 Xaa39 se selecciona de Glu, Gly y Asp;

Xaa40 se selecciona de Gly y Ala;

Xaa43 se selecciona de Asn y Gly; y

Xaa45 se selecciona de Phe y Tyr,

30 en la preparación de un medicamento para tratar la fibrinólisis o fibrinogenolisis inadecuadas, asociadas con circulación extracorpórea, cirrosis hepática, amiloidosis, leucemia promielocítica aguda, tumores sólidos y para bloquear la metástasis tumoral.

2.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido inhibidor de plasmina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63.

35 3.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido inhibidor de plasmina comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 40.