

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 423**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/66 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2004 E 04786615 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 1663281**

54 Título: **Inhibidores de proteasa poli-pegilados**

30 Prioridad:

29.08.2003 US 498845 P
04.08.2004 US 598967 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2014

73 Titular/es:

DYAX CORP. (100.0%)
55 Network Drive
Burlington, MA 01803-2756, US

72 Inventor/es:

LADNER, ROBERT CHARLES;
LEY, ARTHUR C.;
SATO, AARON K. y
STOCHL, MARK

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 447 423 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 proteasa poli-pegilados

5 Resumen

10 En un aspecto, la invención caracteriza a un compuesto que incluye: a) un polipéptido que incluye un dominio de Kunitz que se une específicamente y/o inhibe una proteasa; y b) una pluralidad de polietilenglicol: porciones que están asociadas físicamente con el polipéptido y que aumentan el peso molecular del compuesto como se define en las reivindicaciones. El término "dominio de Kunitz poly-PEGilado" se refiere en la presente al compuesto antes mencionado.

15 El compuesto (es decir, el polipéptido más la pluralidad de porciones no proteicas) tiene un peso molecular mayor que 12, 14 o 16 kDa. En una modalidad, cada porción no proteica tiene un peso molecular promedio de entre 3 y 12 kDa, 3 y 10 kDa, 3 y 8 kDa, 4 y 6 kDa, por ejemplo, aproximadamente 4, 5, 6, 7, o 8 kDa.

20 La proteasa que se une y/o que se inhibe puede ser, por ejemplo, una elastasa (por ejemplo, la elastasa de neutrófilos humana (hNE)), una plasmina, una calicreína, u otra proteasa, por ejemplo, una proteasa descrita en la presente. Por ejemplo, la proteasa puede ser una serina proteasa.

25 Las porciones no proteicas son unidas a cada amina primaria disponible en el dominio de Kunitz, es decir, la amina primaria N-terminal y aminas primarias accesibles de cadenas laterales de lisina en el dominio de Kunitz. Por ejemplo, todas las posibles aminas primarias se conjugan a una de las porciones no proteicas. El dominio de Kunitz puede tener al menos tres o cuatro lisinas. Por ejemplo, el dominio de Kunitz puede tener solamente tres, cuatro, o cinco lisinas. En una modalidad, el polipéptido tiene una amina primaria N-terminal. En otra modalidad, el polipéptido no incluye una amina primaria N-terminal (por ejemplo, el polipéptido se puede modificar químicamente, por ejemplo, con un compuesto no polimérico, en su amina primaria N-terminal de manera que el polipéptido no incluye una amina primaria en esa posición).

30 Una porción no proteica puede unirse a 4 o más de las aminas primarias en el polipéptido. Por ejemplo, todas las lisinas o todas las lisinas que tienen una amina primaria accesible al solvente se unen a una porción no proteica. Preferentemente, el dominio de Kunitz no incluye una lisina dentro de uno de sus bucles de unión, por ejemplo, aproximadamente los residuos correspondientes a los aminoácidos 11-21 de BPTI y 31-42 de BPTI. Las lisinas dentro de dichos bucles de unión pueden reemplazarse, por ejemplo, con residuos de arginina. A menos que se indique de otra manera, cuando se dice que una amina primaria, por ejemplo, la de una lisina particular o en el extremo N terminal, se modifica o tiene una porción no proteica unida a ella, se entiende que la posición de la amina primaria especificada en cada molécula en una preparación no se puede modificar de modo. Las preparaciones no necesitan ser perfectamente homogéneas para estar dentro de la invención. La homogeneidad es deseable en algunas modalidades, pero no tiene que ser absoluta. En modalidades preferidas, al menos 60, 70, 80, 90,95, 97, 98, 99, o 100% de una amina primaria que se designa como modificada tendrá una porción no proteica unida a ella. Otras modalidades sin embargo, incluyen preparaciones que contienen una mezcla de especies en las que la mayoría de las moléculas, por ejemplo, al menos 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99, o 100% son PEGiladas en cuatro o más sitios pero los sitios (y en algunos casos el número de sitios modificados) variará en las moléculas en la preparación. Por ejemplo, algunas moléculas tendrán lisinas A, B, y D modificadas mientras que otras moléculas tendrán el terminal amino y lisinas A, B, C, y D modificadas.

50 El polímero es polietilenglicol. El polímero puede ramificarse o no ramificarse. Por ejemplo, la porción de polímero tiene un peso molecular (por ejemplo, un peso molecular promedio de las porciones añadidas al compuesto) que es menor que 12, 10, 8, 7, o 6 o al menos 1.5, 2, 2.5, 3, 5, 6, 10 kDa, por ejemplo, aproximadamente 5 kDa. En una modalidad, la suma del peso molecular de las porciones PEG en el compuesto es la menos 15, 20, 25, 30, o 35, y/o menos que 60, 50, 40, 35, 30, 25, o 23 kDa.

En una modalidad, el compuesto tiene la siguiente estructura:



en donde P es el polipéptido,

a es al menos 4,

m está entre 0 y 5,

60 X^2 es O N- R^1 , S, o está ausente, en donde R^1 es H, alquilo o arilo,

X^0 es O, N- R^2 , S, o está ausente, en donde R^2 es H, alquilo o arilo, y

R^2 es H, C₁-C₁₂ alquilo o arilo. Por ejemplo, X^2 es O, y R^1 es CH₃. (Se prefiere el uso de mPEG.)

En una modalidad, el polipéptido de dominio de Kunitz es menor que 14, 8, o 7 kDa de peso molecular. En una modalidad, el polipéptido de dominio de Kunitz incluye solamente un dominio de Kunitz. Generalmente, el compuesto incluye solamente un dominio de Kunitz, pero en algunas modalidades, puede incluir más de uno.

5 El dominio de Kunitz incluye la secuencia de aminoácidos de DX-890, DX-88, o DX-1000 o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero menor que seis, cinco, cuatro, tres, dos o diferencias de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones, o deleciones) de la secuencia de aminoácidos de DX-890, DX-88, o DX-1000. Típicamente, el dominio de Kunitz no se produce de forma natural en los seres humanos. El dominio de Kunitz puede incluir una secuencia de aminoácidos que difiere en menos de diez, siete o cuatro aminoácidos de un dominio
10 de Kunitz humano.

En una modalidad, la K_i del compuesto está dentro de un factor de 0.5 a 1.5, 0.8 a 1.2, 0.3 a 3.0, 0.1 a 10.0, o 0.02 a 50.0 de la K_i del polipéptido no modificado para la elastasa. Por ejemplo, la K_i para hNE puede ser menor que 100,
15 50, 18, 12, 10, o 9 pM.

En una modalidad, el compuesto tiene una vida media circulatoria del componente de mayor duración ("vida media circulatoria de fase más larga") en un modelo de conejo o de ratón que es al menos 1.5, 2, 4, u 8 veces mayor que un compuesto sustancialmente idéntico que no incluye el polímero. El compuesto puede tener una vida media circulatoria de fase más larga en el modelo de conejo o de ratón que tiene una amplitud al menos 1.5, 2, 2.5, o 4
20 veces mayor que un compuesto sustancialmente idéntico que no incluye la porción no proteica. El compuesto puede tener una vida media circulatoria fase alfa en un modelo de conejo o de ratón que tiene una amplitud al menos 20, 30, 40, o 50% menor que un compuesto sustancialmente idéntico que no incluye la porción no proteica. Por ejemplo, el compuesto tiene una vida media circulatoria de fase más larga con una amplitud al menos 40, 45, 46, 50, 53, 54, 60, o 65%. En una modalidad, el compuesto tiene una vida media circulatoria fase beta en un modelo de conejo o de
25 ratón de al menos 2, 3, 4, 5, 6, o 7 horas. En una modalidad, el compuesto tiene una vida media circulatoria de fase más larga en un humano de 70 kg de al menos 6 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 5 días, 7 días, o 10 días.

En una modalidad, el compuesto tiene una vida media circulatoria de fase más larga en un modelo de conejo de al menos 4200 minutos, 4700 minutos, o 4980 minutos (o aproximadamente 83 horas). En una modalidad, el compuesto tiene una vida media circulatoria de fase más larga que es mayor que una molécula de tamaño similar con el mismo dominio de Kunitz, pero solamente una única porción PEG (es decir, una versión mono-PEGilada del mismo dominio de Kunitz). La vida media de fase más larga puede ser al menos 5, 10, 20, 30, o 50% más larga. En una modalidad, en un ratón, la vida media circulatoria de fase más larga tiene una amplitud mayor que 50, 55, 60, o 65%. La vida media de fase más larga puede ser, por ejemplo, mayor que 550, 600, 700, 750, 900, 1000, 1100
35 minutos.

En una modalidad, el compuesto tiene una mayor solubilidad (por ejemplo, 1.5, 2, 4, u 8 veces mayor) en una solución acuosa que tiene un pH entre 5 y 8 y una fuerza iónica inferior a la fuerza iónica de NaCl 0,5 M que el polipéptido que no incluye la porción no proteica.
40

En una modalidad, el polietilenglicol se une mediante el acoplamiento de monometoxi-propionaldehído PEG o monometoxi-ácido succinimidil propiónico PEG al polipéptido. El compuesto puede formarse mediante acoplamiento de mPEG ($\text{CH}_3\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-}$) a un pH que permite la unión a grupos amino accesibles en las cadenas laterales de lisina y al grupo amino N-terminal, por ejemplo, un pH 6.8 a 8.8, por ejemplo, entre 7.4 y 8.8.
45

En otro aspecto, la invención caracteriza un compuesto que incluye (1) un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de DX-890, DX-88, o DX-1000 o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero menor que seis, cinco, cuatro, tres, o dos diferencias de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones, o deleciones) de la secuencia de aminoácidos de DX-890, DX-88, o DX-1000, y (2) una pluralidad de porciones de polietilenglicol, como se define en las reivindicaciones. Cada porción de polietilenglicol puede ser menos que 12, 11,
50 10, 9, 8, 7, o 6 kDa de peso molecular y está unida. Cada porción de polietileno se puede unir al polipéptido por un enlace covalente sencillo.

En una modalidad, una molécula de polietilenglicol se une a cada cadena lateral de lisina del polipéptido, por ejemplo, donde el polipéptido incluye tres o cuatro lisinas. En una modalidad, las moléculas de polietilenglicol están entre 4 y 12 kDa de peso molecular. En una modalidad, el polietilenglicol se une al N-terminal y a cada cadena lateral de lisina accesible.
55

En una modalidad, la secuencia de aminoácidos difiere en al menos un aminoácido de la secuencia de aminoácidos de DX-890. La secuencia de aminoácidos es idéntica a la secuencia de aminoácidos de DX-890 en al menos diez, doce, trece, catorce, o la totalidad correspondiente a las posiciones 5, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 30, 31, 32, 34, 38, 39,
60 51, y 55 de acuerdo con la numeración BPTI.

En otro aspecto, la invención caracteriza una preparación que comprende polipéptidos del dominio de Kunitz que se unen específicamente e inhiben una proteasa. Al menos 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99, o 99.5% de los polipéptidos
65

de dominio de Kunitz en la preparación (i) se unen e inhiben la proteasa, y (ii) tienen una porción de polietilenglicol unida a al menos cuatro aminas primarias, en donde dichas aminas primarias consisten de una amina primaria N-terminal y/o aminas primarias de cadenas laterales de lisina, como se define en las reivindicaciones. Típicamente, el peso molecular promedio de cada porción de polietilenglicol unida es menos que 12, 10, o 8 kDa. Por ejemplo, la población designada de polipéptidos de dominio de Kunitz tiene una porción de polietilenglicol unida a cada amina primaria accesible y/o una amina primaria N-terminal.

En una modalidad, cada uno de los polipéptidos de dominio de Kunitz en la preparación se une e inhibe la proteasa. Por ejemplo, los polipéptidos de dominio de Kunitz que no son miembros de la población designada se unen además e inhiben una proteasa, por ejemplo, la misma o una proteasa diferente.

Los polipéptidos de dominio de Kunitz de la población pueden incluir, por ejemplo, otras características descritas en la presente.

La invención caracteriza además una preparación que incluye un compuesto descrito en la presente descripción, por ejemplo, anteriormente. Por ejemplo, el compuesto está presente a una concentración de al menos 0.1, 1.2, o 5 mg de polipéptido por mililitro, por ejemplo, en una solución entre pH 6-8. En una modalidad, el compuesto produce un pico mayor por cromatografía de exclusión por tamaño que incluye al menos 70% del compuesto con relación al inyectado. En una modalidad, el peso molecular de 95% de las especies del compuesto están dentro de 5, 4, 3, 2, o 1 kDa del peso molecular promedio del compuesto.

En otro aspecto, la preparación farmacéutica puede incluir (1) un compuesto descrito en la presente, y (2) un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, al menos 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, o 100% de los compuestos en la preparación tienen una distribución idéntica de moléculas PEG unidas a la misma. El uso de una reacción química en la que todas las aminas primarias disponibles (por ejemplo, todas las aminas primarias accesibles al solvente, o todas las aminas primarias) se modifican se puede usar para proporcionar una preparación en la que los compuestos tienen una distribución idéntica de moléculas de PEG. Por supuesto, alguna variación estará presente en el peso molecular de las porciones unidas a diferentes aminas primarias en una molécula dada o entre las moléculas, ya que hay variación sobre un peso molecular promedio para el reactivo PEG que se usa en la reacción química. La preparación puede fabricarse además mediante el uso de un proceso que proporciona un rendimiento mayor que 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, o 85% para la proteína de entrada.

En una modalidad, la preparación es acuosa y el compuesto está presente a una concentración de al menos 0.1 mg de polipéptido por mililitro. En una modalidad, la inyección de la preparación en un ratón resulta en menos que 50, 30, 25, 15, o 10% del compuesto es un pico SEC con movilidad más alta que la preparación después de 12 horas.

La preparación se puede adecuar para la entrega pulmonar o para la entrega gastrointestinal (por ejemplo, ingestión, rectal, etc.).

En otro aspecto, la preparación farmacéutica puede incluir (1) un compuesto descrito en la presente descripción, y (2) un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, al menos 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, o 100% de los polipéptidos en la preparación tienen al menos 4 aminas primarias modificadas con una porción no proteica. La preparación puede contener una mezcla de especies en la que la mayoría de las moléculas, por ejemplo, al menos 60, 70, 80, 90, o 95% son PEGiladas al menos en los sitios pero los sitios (y en algunos casos el número de sitios modificados) en las moléculas en la preparación pueden variar. Por ejemplo, algunas moléculas tendrán lisinas A, B, y D modificadas mientras que otras moléculas tendrán el terminal amino y lisinas A, B, C, y D modificadas. En algunas modalidades, la preparación puede incluir un pequeño número de compuestos que son inactivos (por ejemplo, menos de 5, 2, 1, o 0.1%), pero generalmente, la mayor parte de los compuestos (por ejemplo, al menos 90, 95, 98, 99, 99.5, o 99.9%) en la preparación están activos, por ejemplo, puede inhibir una proteasa.

En algunos aspectos de la invención, la porción no proteica unida a diferentes sitios será la misma, en términos de identidad o tamaño. En otros aspectos, una primera porción no proteica se une a una primera amina primaria, y una segunda porción no proteica que es diferente, por ejemplo, por tipo o tamaño, se une a una amina primaria diferente. Por ejemplo, se puede desear unir un PEG de un primer tamaño a la amina primaria del extremo N terminal, pero para adherir un PEG de un tamaño diferente a una posición de lisina.

Más aun se describe un dispositivo médico que incluye un dispensador y un compartimiento que incluye una preparación farmacéutica descrita en la presente. Por ejemplo, el dispensador está configurado para generar una forma inhalable de la preparación farmacéutica. La descripción además describe un dispositivo médico implantable que incluye un dispensador y un compartimiento que incluye una preparación farmacéutica descrita en la presente en donde el dispensador se configura para la entrega de la preparación farmacéutica en el sistema circulatorio de un sujeto. Se describe además un supositorio que incluye una preparación farmacéutica descrita en la presente descripción.

En otro aspecto, la invención caracteriza una preparación que incluye un dominio de Kunitz poli-PEGilado como se define en las reivindicaciones. La preparación puede estar sustancialmente (por ejemplo, al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100%) monodispersa. Por ejemplo, el compuesto poli-PEGilado está presente en una concentración de al menos 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, o 2.5 miligramos de polipéptido por mililitro o entre 0.05 y 10 miligramos de polipéptido por mililitro. En una modalidad, la preparación es seca. Por ejemplo, la preparación incluye partículas o está en forma de un polvo.

En otro aspecto, la invención caracteriza un compuesto que incluye un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de DX-890, DX-88, o DX-1000 descrita en la presente en la cual al menos una lisina se sustituye con un aminoácido no lisina, por ejemplo, arginina, como se define en las reivindicaciones. El compuesto es útil para reducir el número de lisinas a las cuales se acopla el PEG, por ejemplo, sin un cambio sustancial en la actividad, para producir un conjugado sustancialmente homogéneo. En una modalidad, el compuesto incluye más aun una porción no proteica, por ejemplo, un polímero hidrófilo descrito en la presente. El polímero puede acoplarse a los residuos de lisina restantes, por ejemplo, una lisina restante (por ejemplo, la primera, segunda, tercera, o cuarta lisina).

En otro aspecto, la invención caracteriza una preparación (por ejemplo, una preparación acuosa) que incluye: un compuesto que incluye un dominio de Kunitz conjugado a una pluralidad de porciones de polietilenglicol como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, la concentración del componente de dominio de Kunitz solo es mayor que 2 mg por ml, el pH de la preparación es mayor que 3, y la resistencia iónica de la preparación es menos que la resistencia iónica de 0.5 M NaCl. En una modalidad, el dominio de Kunitz incluye la secuencia de aminoácidos de DX-890, DX-88, o DX-1000 o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos una, pero menos de seis, cinco, cuatro, tres, o dos diferencias de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones, o deleciones) de la secuencia de aminoácidos de DX-890. Además se contempla un contenedor sellado que incluye la preparación. El contenedor puede ser opaco a la luz. El contenedor puede incluir información impresa en una región externa del contenedor.

En otro aspecto, la invención presenta un método que incluye: proporcionar un polipéptido que incluye un dominio de Kunitz; contactar el polipéptido a un polímero hidrófilo (por ejemplo, un óxido de polialquileño) que incluye un solo grupo reactivo que puede formar un enlace covalente con el polipéptido bajo condiciones adecuadas para la formación de enlace en una pluralidad de sitios disponibles (por ejemplo, una pluralidad de aminas primarias, por ejemplo, todas las aminas primarias disponibles), que proporciona de esta manera un inhibidor de proteasa modificado, tal como se define en las reivindicaciones.

El polímero es un polietilenglicol, por ejemplo, monometoxi-polietilenglicol. Por ejemplo, el polímero es propionaldehído mPEG o ácido succinimidil propiónico mPEG.

En una modalidad, las condiciones son entre pH 6.5 y 9.0, por ejemplo, entre 7.5 y 8.5. En una modalidad, el polímero hidrófilo se une covalentemente al N-terminal del polipéptido. En otra modalidad, el hidrófilo se une covalentemente a una cadena lateral de lisina del polipéptido, como se define en las reivindicaciones.

Más aun, el método puede incluir la separación de polipéptidos que tienen un único polímero unido de otros productos y reactantes. Más aun el método puede incluir la separación de productos cromatográficamente de la puesta en contacto, por ejemplo, usando cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño.

La descripción además incluye un dominio de Kunitz modificado preparado por un método descrito en la presente, por ejemplo, el método anterior.

En otro aspecto, la invención caracteriza un compuesto como se define en las reivindicaciones para usar en un método para tratar un trastorno caracterizado por actividad excesiva o indeseada de una proteasa. El método incluye: administrar a un sujeto que tiene el trastorno o sospechoso de tener el trastorno la composición farmacéutica que comprende un compuesto o preparación que se describe en la presente. El compuesto o preparación incluye un polipéptido de dominio de Kunitz que inhibe la proteasa. Por ejemplo, una preparación tiene al menos un cierto porcentaje de moléculas de polipéptido de dominio de Kunitz en el que un polímero hidrófilo está unido a un primer sitio común y a un segundo sitio común. Por ejemplo, al menos un cierto porcentaje de las moléculas de polipéptido de dominio de Kunitz incluyen además el polímero hidrófilo unido a un tercero, un cuarto, y opcionalmente a un quinto sitio común.

En una modalidad, la proteasa es elastasa. Por ejemplo, el polipéptido de dominio de Kunitz comprende la secuencia de aminoácidos de DX-890 o una secuencia que difiere en al menos uno, pero menos de seis alteraciones de aminoácidos de DX-890. Algunos desórdenes ilustrativos que pueden tratarse usando un dominio de Kunitz que inhibe la elastasa (por ejemplo, la elastasa de neutrófilos humanos) incluyen la fibrosis quística, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y un trastorno inflamatorio.

- 5 En una modalidad, la proteasa es una calicreína. Por ejemplo, el polipéptido de dominio de Kunitz comprende la secuencia de aminoácidos de DX-88 que difiere en al menos una, pero menos de seis alteraciones de aminoácidos de DX-88. Algunos trastornos ilustrativos que pueden tratarse usando un dominio de Kunitz que inhibe una Calicreína incluyen trastornos de la coagulación, la fibrinólisis, las hipotensiones, la inflamación, la hemofilia, la hemorragia post-operatoria, el sangrado perioperatorio, y el angioedema hereditario.
- 10 En una modalidad, la proteasa es plasmina y el polipéptido de dominio de Kunitz comprende la secuencia de aminoácidos de DX-1000 o una secuencia que difiere en al menos una, pero menos de seis alteraciones de aminoácidos de DX-1000. Algunos trastornos ilustrativos que pueden tratarse usando un dominio de Kunitz que inhibe la plasmina incluyen la fibrinólisis o fibrinogenolisis, el sangrado excesivo asociado con trombolíticos, la hemorragia postoperatoria, la hemorragia perioperatoria, y la androgénesis inapropiada.
- 15 Más aun se describe un método para tratar o prevenir un trastorno pulmonar. El método incluye la administración a un sujeto de un compuesto descrito en la presente, por ejemplo, en una cantidad eficaz para mejorar al menos un síntoma del trastorno. Por ejemplo, el compuesto incluye a) un polipéptido que incluye un dominio de Kunitz que específicamente se une e inhibe una elastasa (por ejemplo, la elastasa de neutrófilos humana (hNE)), y b) una porción no proteica que se asocia físicamente con el polipéptido y aumenta el peso molecular del compuesto. Por ejemplo, el compuesto incluye (1) un polipéptido que incluyen, incluso la secuencia de aminoácidos de DX-890 o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos una, pero menos de seis, cinco, cuatro, tres, o dos diferencias de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones, o deleciones) de la secuencia de aminoácidos de DX-890, y (2) polietilenglicol en donde la suma de las porciones de polietilenglicol es al menos 15, 18, 20, 25, 27, o 30 kDa de peso molecular.
- 20
- 25 En una modalidad, el compuesto se administra no más de una vez cada 12, 24, 36, o 72 horas. En otra modalidad, el compuesto se administra no más de una vez cada cuatro, siete, diez, doce o catorce días. El compuesto puede administrarse una vez o múltiples veces (por ejemplo, regularmente).
- 30 En una modalidad, la administración incluye el suministro pulmonar. Por ejemplo, la administración incluye la activación de un inhalador y/o la nebulización. En una modalidad, la administración incluye suministrar la composición directamente o indirectamente en el sistema circulatorio. Por ejemplo, la administración incluye inyección o suministro intravenoso.
- 35 En una modalidad, el sujeto tiene fibrosis quística o un defecto genético en el gen de fibrosis quística. En otra modalidad, el sujeto tiene enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
- El síntoma puede ser por la integridad del tejido pulmonar o un índice de destrucción del tejido.
- 40 Se describe además un método para tratar o prevenir un trastorno inflamatorio. El método incluye: la administración a un sujeto de un compuesto descrito en la presente, por ejemplo, en una cantidad eficaz para mejorar al menos un síntoma del trastorno. Por ejemplo, el compuesto incluye a) un polipéptido que incluye un dominio de Kunitz que específicamente se une e inhibe una elastasa (por ejemplo, la elastasa de neutrófilos humana (hNE)) y b) una pluralidad de porciones no proteica que se asocian físicamente con el polipéptido y aumentan el peso molecular del compuesto. Por ejemplo, el compuesto incluye (1) un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de DX-890 o una secuencia de aminoácidos que difiere por lo menos en uno, pero menos de seis, cinco, cuatro, tres, o dos diferencias de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones, o deleciones) de la secuencia de aminoácidos de DX-890, y (2) una pluralidad de porciones de polietilenglicol, por ejemplo, en donde cada porción de polietilenglicol es de menos de 20, 18, 16, 12, 10, 9, 8, o 7 kDa en peso molecular.
- 45
- 50 En una modalidad, el trastorno es un trastorno inflamatorio del intestino, por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa. En una modalidad, el compuesto se administra como un supositorio.
- 55 En una modalidad, el compuesto se administra no más de una vez cada 12, 24, 36, o 72 horas. En otra modalidad, el compuesto se administra no más de una vez cada cuatro, siete, diez, doce o catorce días. El compuesto puede administrarse una vez o múltiples veces (por ejemplo, regularmente).
- 60 Además se describe un método de tratamiento o prevención de un trastorno caracterizado al menos en parte por la actividad inapropiada de la elastasa o de la actividad de los neutrófilos. El método incluye la administración a un sujeto de un compuesto descrito en la presente, por ejemplo, en una cantidad eficaz para mejorar al menos un síntoma del trastorno o para alterar la actividad de la elastasa o de los neutrófilos, por ejemplo, para reducir la proteólisis mediada por la elastasa. Por ejemplo, el trastorno es artritis reumatoide.
- 65 En una modalidad, el compuesto se administra no más de una vez cada 12, 24, 36, o 72 horas. En otra modalidad, el compuesto se administra no más de una vez cada cuatro, siete, diez, doce o catorce días. El compuesto puede administrarse una vez o múltiples veces (por ejemplo, regularmente).

Muchos de los ejemplos proporcionados en la presente describen métodos y composiciones que se refieren a los dominios de Kunitz y a un objetivo particular de proteasa - la elastasa. Sin embargo, estos métodos y composiciones se pueden modificar. Por ejemplo, las lisinas se pueden posicionar en un sitio donde su modificación no interfiere con la función. De manera similar los métodos y composiciones descritos se pueden modificar a métodos y composiciones correspondientes que se refieren a polipéptidos que incluyen un dominio de Kunitz y otros tipos de dominios.

Como se usa en la presente, "afinidad de unión" se refiere a la constante de asociación aparente o K_a . El K_a es el recíproco de la constante de disociación (K_d). Un ligando puede tener, por ejemplo, una afinidad de unión de al menos 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , o 10^{12} M^{-1} para una molécula objetivo particular. Una mayor afinidad de unión de un ligando a un primer objetivo con relación a un segundo objetivo se puede indicar por una K_a mayor (o una K_d de menor valor numérico) para la unión del primer objetivo que el K_a (o valor numérico K_d) para la unión del segundo objetivo. En tales casos, el ligando tiene especificidad para el primer objetivo con relación a el segundo objetivo. Las mediciones de K_a para la unión a hNE típicamente se realizan bajo las siguientes condiciones: HEPES 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, y 0.1% de Triton X-100 a 30°C que usan 100 pM de la hNE.

La afinidad de unión se puede determinar mediante una variedad de métodos que incluyen la diálisis de equilibrio, el equilibrio de unión, la filtración en gel, el ELISA, la resonancia de plasmón superficial, o la espectroscopia (por ejemplo, que usa un ensayo de fluorescencia). Estas técnicas se pueden usar para medir la concentración de ligando unido y libre como una función de concentración del ligando (u objetivo). La concentración de ligando unido ([Unido]) se relaciona con la concentración de ligando libre ([Libre]) y la concentración de sitios de unión para el ligando en el objetivo donde (N) es el número de sitios de unión por molécula objetivo por la siguiente ecuación:

$$[\text{Unido}] = N \cdot [\text{Libre}] / ((1/K_a) + [\text{Libre}])$$

No siempre es necesario hacer una determinación exacta de K_a , sin embargo, ya que a veces es suficiente para obtener una medición cuantitativa de afinidad determinada, por ejemplo, usando un método tal como el análisis por ELISA o FACS, es proporcional a K_a , y por lo tanto puede ser usado para las comparaciones, tales como la determinación de si una afinidad más alta es, por ejemplo, 2 veces más alta.

Una "composición aislada" se refiere a una composición que se remueve de al menos el 90% de al menos un componente de una muestra natural a partir de la cual se puede obtener una composición aislada. Composiciones producidas artificialmente o naturalmente pueden ser "composiciones de al menos" un cierto grado de pureza si las especies o población de especies de interés es al menos 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 95, 98, o 99% pura en una base peso-peso.

Un "epitopo" se refiere al sitio en un compuesto objetivo que está unido por un ligando, por ejemplo, un ligando polipéptido tal como un dominio de Kunitz, pequeños péptidos, o anticuerpos. En el caso en que el compuesto objetivo es una proteína, por ejemplo, un epitopo puede referirse a los aminoácidos que están unidos por el ligando. Tales aminoácidos pueden ser contiguos o no contiguos con respecto al esqueleto del polipéptido subyacente. Los epítomos superpuestos incluyen al menos un residuo común de aminoácido.

Como se usa en la presente, el término "sustancialmente idénticas" (o "sustancialmente homólogas") se usa en la presente para referirse a una primera secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que contiene un número suficiente de idénticos o equivalentes (por ejemplo, con una cadena lateral similar, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservados) residuos de aminoácidos o nucleótidos a una segunda secuencia de aminoácidos o de nucleótidos tales que las primera y segunda secuencias de aminoácidos o nucleótidos tienen actividades similares. En el caso de los dominios de Kunitz, el segundo dominio tiene la misma especificidad y, por ejemplo, tiene al menos 0.5, 5, o 50% de la afinidad de unión del primer dominio. Un grado suficiente de identidad puede ser aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor.

Las secuencias similares u homólogas (por ejemplo, al menos aproximadamente un 85% de identidad de secuencia) a las secuencias descritas en la presente son además parte de esta aplicación. En alguna modalidad, la identidad de secuencia puede ser aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor. Alternativamente, existe identidad sustancial cuando los segmentos de ácido nucleico se hibridarán bajo condiciones de hibridación selectivas (por ejemplo, condiciones de hibridación altamente restrictivas), con el complemento de la hebra. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura.

Los cálculos de "homología" o de "identidad de secuencia" entre dos secuencias (los términos se usan indistintamente en la presente) se realizan como sigue. Las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse interrupciones en una o en ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para la alineación óptima y las secuencias no homólogas pueden no tenerse en cuenta para propósitos de comparación). En una modalidad preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada con propósitos comparativos es de al menos un 30%, preferentemente de al menos un 40%, con

mayor preferencia de al menos un 50%, incluso con mayor preferencia de al menos un 60%, e incluso con mayor preferencia de al menos un 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Los residuos de aminoácidos o de nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o en las posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan después. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en la presente la "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a la "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático. En una modalidad preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo Needleman y Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453) el cual se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de programas GCG, que usa ya sea una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de interrupción de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En aún otra modalidad preferida, el por ciento de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina mediante el uso del programa GAP en el paquete de software GCG, que usa una matriz NWSgapdna.CMP y un peso del interrupción de 40, 50, 60, 70, o 80 y un peso del longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Un conjunto preferido de parámetros (y el que se debe usar si el practicante tiene dudas sobre qué parámetros se deben aplicar para determinar si una molécula está dentro de una limitación de identidad u homología de secuencia de la invención) son una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización de interrupción de 12, una penalización extendida de interrupción de 4, y una penalización de interrupción de desplazamiento de marco de 5.

Como se usa en la presente, el término "homólogo" es sinónimo de "similitud" y significa que una secuencia de interés difiere de una secuencia de referencia por la presencia de una o más sustituciones de aminoácidos (aunque inserciones o deleciones de aminoácidos modestas) además pueden estar presentes. En la actualidad los medios preferidos de cálculo de grados de homología o similitud con una secuencia de referencia son mediante el uso de algoritmos BLAST (disponible en el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) de los Institutos Nacionales de Salud, Bethesda MD), en cada caso, que usa el algoritmo por defecto o los parámetros recomendados para determinar la significación de la relación de la secuencia calculada. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos además puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller ((1989) CABIOS, 4:11-17) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de peso de residuos PAM120, una penalización de longitud de interrupción de 12 y una penalización por interrupción de 4.

Como se usa en la presente, el término "hibrida en condiciones de baja rigurosidad, rigurosidad media, alta rigurosidad o rigurosidad muy alta" describe condiciones de hibridación y lavado. Una guía para realizar las reacciones de hibridación se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, la cual se incorpora como referencia. Métodos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia y también se pueden usar. Las condiciones de hibridación específicas referidas en la presente son las siguientes: 1) las condiciones de hibridación de baja rigurosidad en cloruro de sodio 6X/ citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguidas de dos lavados en SSC 0.2X, 0.1% de SDS al menos a 50°C (la temperatura de los lavados puede aumentarse a 55°C para condiciones de baja rigurosidad); 2) las condiciones de hibridación de rigurosidad media en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguidas de uno o más lavados en SSC 0.2X, 0.1% de SDS a 60°C; 3) las condiciones de hibridación de alta rigurosidad en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguidas por uno o más lavados en SSC 0.2X, 0.1% de SDS a 65°C, y preferentemente 4) las condiciones de hibridación de muy alta rigurosidad son fosfato sódico 0.5 M, 7% de SDS a 65°C, seguidas de uno o más lavados en SSC 0.2X, 1% de SDS a 65°C. Condiciones de rigurosidad muy alta (4) son las condiciones preferidas y las que se deben usar a menos que se especifique de otra manera. En consecuencia, los ácidos nucleicos que se hibridan con el rigor adecuado a los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido descrito en la presente se proporcionan como son los polipéptidos que se codifican por dichos ácidos nucleicos. Tales polipéptidos se pueden modificar de manera similar como se describe en la presente.

Se entiende que un polipéptido descrito en la presente (por ejemplo, un polipéptido que incluye un dominio de Kunitz) puede tener mutaciones con relación a un polipéptido particular que se describe en la presente (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservados o no esenciales), que no tienen un efecto sustancial en las funciones de polipéptidos. Si una sustitución particular se tolerará o no, es decir, no afectará negativamente a las propiedades biológicas deseadas, tales como la actividad de unión se puede determinar como se describe en Bowie, y otros (1990) Science 247:1306-1310. Una "sustitución conservativa de aminoácidos" es una en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se definen en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales de ácidos (por ejemplo, el ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina,

valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Es posible para muchos residuos de aminoácidos de marcos y de CDR incluir una o más sustituciones conservativas.

5 Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que se puede alterar a partir de la secuencia de tipo salvaje del agente de unión, por ejemplo, el anticuerpo, sin abolir o con mayor preferencia, sin alterar sustancialmente una actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" resulta en un cambio tal.

10 Los términos "polipéptido" o "péptido" (que pueden usarse indistintamente) se refieren a un polímero de tres o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico, por ejemplo, entre 3 y 30, 12 y 60, o 30 y 300, o más de 300 aminoácidos de longitud. El polipéptido puede incluir uno o más aminoácidos no naturales. Típicamente, el polipéptido incluye solamente aminoácidos naturales. Una "proteína" puede incluir una o más cadenas de polipéptido. Por consiguiente, el término "proteínas" abarca los polipéptidos. Una proteína o polipéptido puede incluir además una o más modificaciones, por ejemplo, una glicosilación, una amidación, una fosforilación, y así sucesivamente. El término "péptido pequeño" se puede usar para describir un polipéptido que está entre 3 y 30 aminoácidos de longitud, por ejemplo, entre 8 y 24 aminoácidos de longitud.

20 El término "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo que puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada, que contiene el número de átomos de carbono indicado. Por ejemplo, C₁-C₁₂ alquilo indica que el grupo puede tener de 1 a 12 (inclusivo) átomos de carbono en este.

El término "arilo" se refiere a un sistema anular hidrocarburo monocíclico, bicíclico, o tricíclico aromático, en donde cualquier átomo del anillo capaz de sustitución se puede sustituir por un sustituyente. Los ejemplos de porciones arilo incluyen, pero sin limitarse a, fenilo, naftilo, y antraceno.

25 Los detalles de una o más modalidades de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción más abajo. Otras características, objetos, y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

30 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa la estructura de DX-890 (sec. con núm. de ident.:23) y la posición de sus cuatro residuos de lisina.

La FIG. 2 representa la estructura de DX-88 (sec. con núm. de ident.:24) y la posición de sus tres residuos de lisina.

35 La FIG. 3 representa la estructura de DX-1000 (sec. con núm. de ident.:25) y la posición de sus tres residuos de lisina.

La FIG. 4 es un esquema ilustrativo de PEGilación. El pH de la reacción se puede ejecutar a un pH de entre 7.8 y 8.5.

La FIG. 5 muestra los resultados ilustrativos de un análisis MALDI.

40 La FIG. 6 muestra los resultados ilustrativos de ejecuciones de GP-HPLC.

La FIG. 7 muestra los resultados ilustrativos de análisis de SDS-PAGE.

La FIG. 8a muestra resultados ilustrativos de estudios de limpieza en ratones y 8b muestra estudios de limpieza en conejos. Los datos se representaron usando un parámetro de desintegración exponencial doble 4. La Fig 8c muestra una extrapolación alométrica para los seres humanos. Los valores extrapolados para la fase larga de vida media de limpieza en un ser humano de 70 Kg fueron los siguientes: DX-890, 8.4 horas; 5 PEG5-DX-890, a 330 horas, o aproximadamente 14 días; DX-1000, 1.7 horas; 4-PEGS-DX-1000, 210 horas, o aproximadamente 9 días.

La FIG. 9 muestra los resultados ilustrativos de poli-PEGilación DX-88 en varias razones por análisis de SDS-PAGE.

50 Descripción detallada

La invención proporciona, en parte, los compuestos que se unen a e inhiben una proteasa (por ejemplo, una elastasa, por ejemplo, una elastasa de los neutrófilos). Los compuestos incluyen (i) un polipéptido que incluye un dominio de Kunitz y (ii) una pluralidad de porciones (tales como porciones de polímero) que aumenta el peso molecular de los compuestos con relación a el polipéptido solo, como se define en las reivindicaciones. La adición de las porciones al compuesto puede aumentar la vida media circulatoria en vivo del compuesto. En algunas modalidades, los compuestos pueden inhibir la elastasa de los neutrófilos con alta afinidad y selectividad.

60 Polímeros

Una variedad de porciones se puede usar para aumentar el peso molecular de un polipéptido que incluye un dominio de Kunitz o de otro inhibidor de proteasa. En una modalidad, la porción es polietilenglicol, un polímero soluble en agua y/o sustancialmente no antigénico. La porción puede mejorar la estabilización y/o retención del dominio de Kunitz en circulación, por ejemplo, de la sangre, el suero, la linfa, u otros tejidos, por ejemplo, por lo menos 1.5, 2, 5,

10, 50, 75, o 100 veces. Una pluralidad de porciones están unidas a un dominio de Kunitz. Por ejemplo, el polipéptido está unido a al menos cuatro porciones de polímero. Cada lisina del polipéptido se puede unir a una porción del polímero.

5 Los polímeros adecuados pueden variar sustancialmente en peso. Por ejemplo, es posible usar polímeros que tienen pesos moleculares medios que van desde, por ejemplo, 1-12 kDa, 4-12 kDa o 3-8 kDa, por ejemplo, aproximadamente 4, 5, 6, o 7 kDa. En una modalidad, el peso molecular promedio de porciones individuales del polímero que se asocian con el compuesto son menos de 12, 10, 8, o 7 kDa. El peso molecular final puede además depender del tamaño eficaz deseado del conjugado, la naturaleza (por ejemplo, estructura, tal como lineal o ramificada) del polímero, y el grado de derivación.

15 El polipéptido que incluye un dominio de Kunitz se puede asociar físicamente con el polímero en una variedad de maneras. Típicamente, el polipéptido está enlazado covalentemente al polímero en una pluralidad de sitios. Por ejemplo, el polipéptido se conjuga con el polímero en una pluralidad de aminas primarias, por ejemplo, todas las aminas primarias accesibles o todas las aminas primarias. Otros compuestos también se pueden unir al mismo polímero, por ejemplo, una citotoxina, un marcador, u otro agente de dirección, por ejemplo, otro ligando que se une al mismo objetivo como el dominio de Kunitz o un ligando que se une a otro objetivo, por ejemplo, un ligando no relacionado. Otros compuestos pueden unirse además al polipéptido.

20 En una modalidad, el polímero es soluble en agua antes de la conjugación con el polipéptido (aunque no tiene por qué ser). En general, después de la conjugación con el polipéptido, el producto es soluble en agua, por ejemplo, exhibe una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 0.01 mg/ml, y con mayor preferencia de al menos aproximadamente 0.1 mg/ml, y aún con mayor preferencia de al menos aproximadamente 1 mg/ml. Adicionalmente, el polímero no debe ser altamente inmunogénico en la forma conjugada, ni debe poseer viscosidad que sea incompatible con la infusión o inyección intravenosa si el conjugado está destinado a administrarse por tales rutas.

25 En una modalidad, el polímero contiene un solo grupo que es reactivo. Esto ayuda a evitar la conjugación de un polímero a múltiples moléculas de proteína. Los polietilenglicoles monometoxi-terminados (mPEG's); C₁₋₄ polímeros alquil-terminados; y óxidos de polietileno bis-activados (glicoles) se pueden usar para la conjugación con el polipéptido. Ver, por ejemplo, U.S. 5,951,974.

En su forma más común, el poli (etilenglicol), PEG, es un poliéter lineal o ramificado terminado con grupos hidroxilo. El PEG lineal puede tener la siguiente estructura general:



El PEG se puede sintetizar por polimerización de apertura de anillo aniónica de óxido de etileno iniciada por un ataque nucleofílico de un ion hidróxido sobre el anillo de epóxido. Es particularmente útil para la modificación del polipéptido el monometoxi PEG, mPEG, que tiene la estructura general:



45 Para descripciones adicionales, ver, por ejemplo, Roberts y otros (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459-476. En una modalidad, las unidades de polímero usadas para la conjugación son mono-dispersas o de otra manera altamente homogéneas, por ejemplo, presentes en una preparación en la que el 95% o todas las moléculas están con 7, 5, 4, 3, 2, o 1 kDa una de otra. En otra modalidad, las unidades de polímero son poli-dispersas.

50 Es posible seleccionar las condiciones de reacción que reducen el entrecruzamiento entre las unidades de polímero o la conjugación a múltiples polipéptidos y para purificar los productos de reacción a través de filtración en gel o de cromatografía de intercambio iónico para recuperar sustancialmente derivados homogéneos, por ejemplo, derivados que incluyen sólo un único polipéptido de dominio de Kunitz. En otras modalidades, el polímero contiene dos o más grupos reactivos con el propósito de enlazar múltiples polipéptidos (por ejemplo, múltiples unidades de polipéptido de dominio de Kunitz) al polímero. Una vez más, la filtración en gel o la cromatografía de intercambio iónico se puede usar para recuperar el derivado deseado en forma sustancialmente homogénea.

55 El polipéptido que incluye un dominio de Kunitz está generalmente unido a una pluralidad de moléculas de PEG. Por ejemplo, para formar un compuesto que es mayor de 20 o 30 kDa, un dominio de Kunitz (aproximadamente 7 kDa) se puede conectar a al menos tres moléculas de 8 kDa de PEG. Otras combinaciones son posibles, por ejemplo, al menos dos, cuatro, o cinco moléculas de PEG. El peso molecular de las moléculas de PEG se pueden seleccionar de manera que el peso molecular final del compuesto es igual a o mayor que un peso molecular deseado (por ejemplo, entre 17-35, o 20-25, o 27-33 kDa). La pluralidad de moléculas de PEG se puede unir a cualquier región del dominio de Kunitz, preferentemente a al menos 5, 10, o 15 Angstroms de una región que interacciona con un objetivo, o al menos a 2, 3, o 4 residuos de un aminoácido que interactúa con un objetivo. Las moléculas de PEG se pueden unir, por ejemplo, a residuos de lisina o a una combinación de residuos de lisina y el extremo N-terminal.

65

Un enlace covalente se puede usar para unir un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido que incluye un dominio de Kunitz) a un polímero, por ejemplo, la conjugación al grupo amino N-terminal y grupos amino epsilon encontrados en los residuos de lisina, así como otro grupo amino, imino, carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo u otros grupos hidrofílicos. El polímero se puede covalentemente unir directamente al polipéptido sin el uso de un agente de entrecruzamiento multifuncional (ordinariamente bifuncional) agente de reticulación. La unión covalente a grupos amino se puede lograr mediante las químicas conocidas basadas en cloruro cianúrico, diimidazol carbonil, grupos reactivos de aldehídos (PEG alcóxido más dietil acetilo de bromoacetaldehído; PEG más DMSO y anhídrido acético, o cloruro de PEG más el fenóxido de 4-hidroxibenzaldehído, succinimidil ésteres activados, ditiocarbonato PEG activado, 2,4,5-trichlorofenilcloroformato o P-nitrofenilcloroformato PEG activado.). Los grupos carboxilo se pueden derivar por el acoplamiento PEG-amino primaria usando carbodiimida. Los grupos sulfhidrilo se pueden derivar por el acoplamiento a maleimido-PEG sustituido (véase, por ejemplo, WO 97/10847) o a PEG-maleimida (por ejemplo, disponibles comercialmente por Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Ala.). Alternativamente, los grupos amino libres en el polipéptido (por ejemplo, grupos amino epsilon de residuos de lisina) se pueden tiolar con 2-imino-tiolano (reactivo de Traut) y después acoplarse a derivados de PEG que contienen maleimida, por ejemplo, como se describe en Pedley y otros, Br. J. Cancer, 70: 1126-1130 (1994).

Los polímeros de PEG funcionalizados que se pueden unir a un polipéptido que incluye dominio de Kunitz incluyen polímeros que están disponibles comercialmente, por ejemplo, por Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Ala.). Tales derivados de PEG incluyen, por ejemplo, amino-PEG, ésteres de aminoácidos de PEG, PEG-hidrazida, PEG-tiol, PEG-succinato, PEG carboximetilado, PEG-ácido propiónico, aminoácidos PEG, PEG succinato de succinimidilo, PEG propionato de succinimidilo, éster de succinimidilo de PEG carboximetilado, carbonato de succinimidilo de PEG, ésteres de succinimidilo de aminoácidos PEGs, PEG-oxicarbonilimidazol, carbonato de nitrofenilo-PEG, PEG tresilato, PEG-éter de glicidilo, PEG-aldehído, PEG vinilsulfona, PEG-maleimida, PEG-ortopiridilo-disulfuro, los PEG heterofuncionales, derivados de PEG de vinilo, silanos de PEG, y fosfolidos de PEG. Las condiciones de reacción para acoplar estos derivados de PEG pueden variar dependiendo del polipéptido, el grado deseado de PEGilación y el derivado de PEG utilizado. Algunos factores implicados en la elección de derivados de PEG incluyen: el punto deseado de unión (tal como grupos-R de lisina o cisteína), la estabilidad hidrolítica y reactividad de los derivados, la estabilidad, la toxicidad y antigenicidad del enlace, la idoneidad para análisis, etc.

Los conjugados de un polipéptido que incluyen un dominio de Kunitz y un polímero se puede separar de los materiales de partida sin reaccionar usando métodos cromatográficos, por ejemplo, por filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, HPLC. Las especies heterólogas de los conjugados se purifican una de otra de la misma manera. La resolución de diferentes especies (por ejemplo, que contienen uno o dos residuos PEG) es además posible debido a la diferencia en las propiedades iónicas de la aminoácidos sin reaccionar. Ver, por ejemplo, WO 96/34015.

Dominios de Kunitz

Como se usa en la presente, un "dominio de Kunitz" es un dominio de polipéptido con al menos 51 aminoácidos y que contiene al menos dos, y preferentemente tres, disulfuros. El dominio se pliega de tal manera que las primera y la sexta cisteínas, la segunda y la cuarta, y la tercera y la quinta cisteínas forman puentes disulfuro (por ejemplo, en un dominio de tipo Kunitz que tiene 58 aminoácidos, las cisteínas pueden estar presentes en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 5, 14, 30, 38, 51, y 55, de acuerdo con el número de la secuencia de BPTI que se proporciona más abajo, y los disulfuros se pueden formar entre las cisteínas en las posiciones 5 y 55, 14 y 38, y 30 y 51), o, si dos disulfuros están presentes, ellos se pueden formar entre un subconjunto correspondiente de cisteínas de los mismos. La separación entre las respectivas cisteínas puede estar dentro de 7, 5, 4, 3 o 2 aminoácidos del siguiente espaciado entre las posiciones correspondientes a: de 5 a 55, de 14 a 38, y de 30 a 51, de acuerdo con la numeración de la secuencia de BPTI que se proporciona más abajo. La secuencia de BPTI se puede usar como una referencia para referirse a posiciones específicas en cualquier dominio de Kunitz genérico. La comparación de un dominio de Kunitz de interés con el BPTI se puede llevar a cabo por la identificación del mejor alineamiento adaptado en el cual el número de cisteínas alineadas es maximizado

La estructura 3D (a alta resolución) del dominio de Kunitz de BPTI se conoce. Una de las estructuras de rayos-X se deposita en el Banco de Datos de Proteínas Brookhaven como "6PTI". La estructura 3D de algunos homólogos de BPTI (Eigenbrot y otros, (1990) Protein Engineering, 3(7):591-598; Hynes y otros, (1990) Biochemistry, 29:10018-10022) se conoce.

Tabla 1: Dominios de Kunitz naturales ilustrativos

BPTI (sec. con núm. de ident.:2)	
----------------------------------	--

	1	2	3	4	5
	123456789012345678901234567890123456789012345678				
	RPDF <u>C</u> LE <u>S</u> PPY <u>T</u> GP <u>C</u> KARIIRYFYNAKAGL <u>C</u> Q <u>T</u> FVYGG <u>C</u> RAKRN <u>N</u> FKSAED <u>C</u> MRT <u>C</u> GG <u>A</u>				

Los dominios de Kunitz útiles para seleccionar inhibidores de proteasa pueden incluir los dominios de Kunitz que tienen una región del marco con un número particular de residuos de lisinas. En una implementación, los marcos con cuatro residuos de lisinas son útiles y se pueden modificar, por ejemplo, mediante la unión de porciones de PEG de peso molecular promedio entre 3-8 kDa, por ejemplo, de aproximadamente 5 kDa. Por ejemplo, el marco ITI tiene cuatro lisinas. En otra implementación, los marcos con tres lisinas son útiles y se pueden modificar por ejemplo, mediante la unión de porciones de PEG de peso molecular promedio entre 4-10 kDa, por ejemplo, aproximadamente de 5 kDa o 7 kDa. LACI es uno de esos marcos. Los marcos se pueden además alterar para incluir menos o más lisinas, por ejemplo, para reducir el número de lisinas que están dentro de cinco, cuatro, o tres residuos de un bucle de unión, o para introducir un número suficiente de lisinas que la proteína se pueda modificar con pequeñas porciones de PEG (por ejemplo, entre 3-8 kDa porciones de PEG) para incrementar el tamaño y la estabilidad de la proteína en vivo.

El dominio de Kunitz interactúa con la proteasa prevista usando, principalmente, aminoácidos en dos regiones de bucles ("bucles de unión"). La primera región de bucle está entre los residuos que corresponden a los aminoácidos 11-21 de BPTI. La segunda región de bucle está entre los residuos que corresponden a los aminoácidos 31-42 de BPTI. Una biblioteca ilustrativa de dominios de Kunitz varía una o más posiciones de aminoácidos en la primera y/o la segunda regiones de bucle. Las posiciones particularmente útiles para variar incluyen: posiciones 13, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 34, y 39 con respecto a la secuencia de BPTI. Al menos algunas de estas posiciones se esperan que estén en estrecho contacto con la proteasa objetivo.

La "región del marco" de un dominio de Kunitz se define como aquellos residuos que son una parte del dominio de Kunitz, pero específicamente que excluyen los residuos en las primeras y segundas regiones de bucles de unión, es decir, aproximadamente los residuos correspondientes a los aminoácidos 11-21 de BPTI y 31-42 de BPTI

A la inversa, los residuos que no están en estas posiciones particulares o los cuales no están en las regiones de bucle pueden tolerar un más amplio intervalo de sustitución de aminoácidos (por ejemplo, las sustituciones conservativas y/o no-conservativas) que estas posiciones de aminoácidos.

Dominios de Kunitz inhibidores de elastasa

Un polipéptido ilustrativo que une e inhibe a la elastasa de neutrófilos humana (hNE) es DX-890 (además conocido como "EPI-hNE4"). DX-890 es un inhibidor altamente específico y potente ($K_i = 4 \times 10^{-12}$ M) de elastasa de neutrófilos humana (hNE). DX-890 incluye la siguiente secuencia de aminoácidos:

Glu Ala Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Ile Ala
Phe
Phe Pro Arg Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val
Leu
Phe Pro Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr
Ser
Glu Lys Glu Cys Arg Glu Tyr Cys Gly Val Pro (sec. con núm. de ident.:23)

DX-890 se deriva a partir del segundo dominio de tipo Kunitz de la proteína inter- α -inhibidora (ITI-D2) y puede producirse mediante la fermentación en *Pichia pastoris*. Incluye 56 aminoácidos, con un PM predicho de 6,237 Daltons. DX-890 es resistente a la inactivación oxidativa y proteolítica.

In vitro, *ex vivo* e *in vivo* los estudios farmacológicos demostraron la capacidad inhibidora de hNE y el efecto protector de DX-890 contra lesiones inducidas por hNE de esputo de niños con fibrosis quística (ver la ref. Delacourt y otros. 2002). Los estudios agudos y subcrónicos de 4 semanas de DX-890 en aerosol en monos cynomolgus no muestran signos de toxicidad clínica o biológica, ni de lesiones histopatológicas inducidas por la administración de DX-890.

En estudios clínicos que usan voluntarios humanos sanos, se determinó que DX-890 es seguro para la administración por inhalación de 8 dosis en incremento (hasta 120 minutos de DX-890 en salino que resulta en una masa inhalada de aproximadamente 72 mg).

5 Algunas de las consecuencias de la actividad elastasa incluyen: la escisión de receptores de complemento y C3bi; la escisión de inmunoglobulinas; la degradación de elastina (y consecuentemente la obstrucción de las vías respiratorias, daño estructural, broncoestasis); la secreción de macromoléculas; el incremento de interleucina-8; el incremento en PMN (y consecuentemente la liberación de oxígeno, peróxido de hidrógeno, leucotrieno B4 e interleucina-8); y la persistencia de las bacterias. Los inhibidores de elastasa pueden usarse para reducir una o más de estas actividades.

10 DX-890 puede usarse como un medicamento antiinflamatorio previsto contra la inflamación mediada por neutrófilos, por ejemplo, en lesiones pulmonares de FQ. Las indicaciones pulmonares ilustrativas incluyen la Fibrosis Quística (FQ), el Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (SDRA), y la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). En los pacientes con FQ, el balance entre las proteinasas y sus inhibidores puede llegar a ser severamente disturbado. Los leucocitos polimorfonucleares activados (PMN) producen elastasa de neutrófilos humana (hNE) y otras proteasas. La hNE se considera que es la causa clave del daño del tejido pulmonar asociado con la fibrosis quística. La inhibición de hNE es por lo tanto una vía lógica para el tratamiento de la enfermedad pulmonar FQ ya que ataca la fuente original de daño en lugar de mejorar los síntomas y las consecuencias del daño.

15 Es posible, por ejemplo, suministrar DX-890 al pulmón por nebulización. Se detectó la actividad de DX-890 en lavados bronco-alveolares de voluntarios que inhalaban DX-890 nebulizado. 12 voluntarios sanos recibieron durante 20 14 días una única dosis diaria de DX-890, por nebulización que dura 5 o 20 minutos, correspondiente a una masa estimada inhalada de 3.75 o 15 mg respectivamente. La tolerabilidad fue excelente; no se reportó ningún evento adverso significativo. No se observaron anomalías clínicas o biológicas.

25 Con respecto a las indicaciones pulmonares, DX-890 puede usarse para tratar, por ejemplo, fibrosis quística (FQ), Síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

Existen además correlaciones conocidas entre la estructura de DX-890 y su habilidad para unirse a la hNE.

Tabla 3: Aminoácidos ilustrativos para los inhibidores de hNE

Algunos aminoácidos preferidos en dominios de Kunitz inhibidores de hNE posición permitida de aminoácidos en posiciones de aminoácidos que corresponden a las posiciones respectivas en BPTI	
5	C
10	YSVN
11	TARQP
12	G
13	PAV
14	C
15	IV
16	AG
17	FILVM
18	F
19	PSQKR
20	R
21	YWF
30	C
31	QEV
32	TLP
33	F
34	VQP
35	Y
36	G
37	G

Algunos aminoácidos preferidos en dominios de Kunitz inhibidores de hNE posición permitida de aminoácidos en posiciones de aminoácidos que corresponden a las posiciones respectivas en BPTI	
38	C
39	MQ
40	GA
41	N
42	G
43	N
45	F
51	C
55	C

"La protección contra una herida de pulmón aguda mediante el pretratamiento intravenoso o intratraqueal con EPI-HNE4, un nuevo inhibidor potente de la elastasa de neutrófilo." Delacourt C, Herigault S, Delclaux C, y otros Am J Respir Cell Mol Biol 2002;26:290-7 y Grimbert y otros (2003) "Características del aerosol EPI-hNE4: un nuevo inhibidor de elastasa para el tratamiento de la fibrosis quística" J Aerosol Med. 16(2):121-9.

Identificación del dominio de Kunitz y otros inhibidores de proteasa

Una variedad de métodos pueden usarse para identificar una proteína que se une a y/o inhibe una proteasa. Estos métodos pueden usarse para identificar dominios de Kunitz de origen natural y no-natural que pueden usarse como componentes de los compuestos descritos en la presente descripción.

Por ejemplo, un dominio de Kunitz puede identificarse a partir de una genoteca de proteínas en la que cada una pluralidad de miembros de la genoteca incluye un dominio de Kunitz variado. Una variedad de aminoácidos puede variarse en el dominio. Ver, por ejemplo, U.S. 5,223,409; U.S. 5,663,143, y U.S. 6,333,402. Los dominios de Kunitz pueden variarse, por ejemplo, mediante el uso de mutagénesis de ADN, transposición de ADN, síntesis química de oligonucleótidos (por ejemplo, mediante el uso de codones como subunidades), y clonación de genes naturales. Ver, por ejemplo, U.S. 5,223,409 y U.S. 2003-0129659.

La genoteca puede ser una genoteca de expresión que se usa para producir proteínas. Las proteínas pueden ser dispuestas, por ejemplo, mediante el uso de una matriz de proteínas. US 5,143,854; De Wildt y otros (2000) Nat. Biotechnol. 18:989-994; Lueking y otros (1999) Anal. Biochem. 270:103-111; Ge (2000) Nucleic Acids Res. 28, e3, I-VII; MacBeath y Schreiber (2000) Science 289:1760-1763; WO 0/98534, WO01/83827, WO02/12893, WO 00/63701, WO 01/40803 y WO 99/51773.

Las proteínas se pueden exhibir además en un empaque genético replicable, por ejemplo, en forma de una genoteca de fago tales como una exhibición de fago, genoteca de exhibición de levadura, exhibición de ribosoma, o genoteca de fusión proteína-ácido nucleico. Ver, por ejemplo, U.S. 5,223,409; Smith (1985) Science 228:1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; de Haard y otros (1999) J. Biol. Chem 274:18218-30; Hoogenboom y otros (1998) Immunotechnology 4:1-20; Hoogenboom y otros (2000) Immunol Today 2:371-8; Fuchs y otros (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay y otros (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse y otros (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths y otros (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins y otros (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson y otros (1991) Nature 352:624-628; Gram y otros (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard y otros (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Rebar y otros (1996) Methods Enzymol. 267:129-49; Hoogenboom y otros (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; y Barbas y otros (1991) PNAS 88:7978-7982 en ejemplos de exhibición de fago y otros métodos. Ver, por ejemplo, Boder y Wittrup (1997) Nat. Biotechnol. 15:553-557 y WO 03/029456 en ejemplos de exhibición de células de levadura y otros métodos. Ver, por ejemplo, Mattheakis y otros (1994) Proc. Natl. Acad. Sciences. USA 91:9022 y Hanes y otros (2000) Nat Biotechnol. 18:1287-92; Hanes y otros (2000) Methods Enzymol. 328:404-30. y Schaffitzel y otros (1999) J Immunol Methods. 231(1-2):119-35 en ejemplos de exhibición de ribosoma y otros métodos. Ver, por ejemplo, Roberts y Szostak (1997) Proc. Natl. Acad. Sciences. USA 94:12297-12302, y patente de Estados Unidos núm. 6,207,446 en ejemplos de fusiones proteína-ácido nucleico. Tales genotecas pueden tamizarse en un formato de alto rendimiento. Ver, por ejemplo, U.S. 2003-0129659.

Las genotecas de dominios de Kunitz pueden generarse mediante la variación de uno o más residuos de aminoácidos unidos al sitio de bucle mediante el uso de un dominio de Kunitz descrito en la presente descripción, por ejemplo, un dominio de Kunitz que tiene un marco descrito en la presente descripción, por ejemplo, una región

marco de origen natural o modificada. En una modalidad, los residuos que se varían son varios entre una pluralidad de aminoácidos. La pluralidad se selecciona tal que la lisina no está disponible.

Tamizaje de genotecas de exhibición

5 Esta sección describe métodos ilustrativos para tamizar una genoteca de exhibición que identifica un polipéptido que interactúa con una elastasa. Estos métodos pueden modificarse para identificar otros polipéptidos que interactúan con otros objetivos, por ejemplo, otras proteasas u otras proteínas. Los métodos se pueden modificar además y usar en conjunto con otros tipos de genotecas, por ejemplo, una genoteca de expresión o una matriz de proteínas, y
10 demás.

15 En un tamiz ilustrativo de la genoteca de exhibición, una genoteca de fago se pone en contacto con y permite unirse con la proteína elastasa objetivo (por ejemplo, una forma activa o una inactiva (por ejemplo, proteína mutante o químicamente inactiva) o un fragmento de esta). Para facilitar la separación de aglutinantes y no-aglutinantes en el proceso de tamizaje, es frecuentemente conveniente inmovilizar la elastasa en un soporte sólido, aunque es posible también permitir primero la unión con la elastasa en solución y separar después los aglutinantes de no-aglutinantes acoplado el compuesto objetivo a un soporte. En forma de ilustración, cuando se incuban en presencia de la elastasa, el fago que exhibe un polipéptido que interactúa con la elastasa forma un complejo con la elastasa inmovilizada en un soporte sólido mientras que el fago que no se une permanece en solución y puede lavarse con
20 tampón. El fago unido se puede liberar después a partir de la elastasa con un número de medios, tales como modificar el tampón a un pH relativamente alto ácido o básico (por ejemplo, pH 2 o pH 10), modificar la fuerza iónica del tampón, añadir desnaturizantes, añadir un competidor, añadir una célula huésped que se puede infectar, u otros medios conocidos.

25 Por ejemplo, para identificar los péptidos de unión a la elastasa, la elastasa puede adsorberse a una superficie sólida, tal como la superficie plástica de pocillos en una placa de ensayo multi-pocillo. A continuación, una alícuota de una genoteca de exhibición de fago se añade a un pocillo bajo condiciones apropiadas que mantienen la estructura de la elastasa y el fago inmovilizadas, tal como pH 6-7. En las genotecas que exponen los polipéptidos que se unen a la elastasa inmovilizada, los fagos se unen a la elastasa y se retienen en el pocillo. El fago que no se une puede eliminarse. Es posible además incluir un agente de bloqueo o ligando de competencia durante la unión de la genoteca de fago a la elastasa inmovilizada.
30

35 El fago unido a la elastasa inmovilizada puede eluir después mediante el lavado con una solución de tampón que tiene un pH ácido relativamente fuerte (por ejemplo, pH 2) o un pH alcalino (por ejemplo, pH 8-9). Las soluciones de fago recuperado que se eluyen de la elastasa se neutralizan después y pueden, si se desea, mezclarse como una población de la genoteca mixta enriquecida de fagos que exhiben péptidos de unión a la elastasa. Alternativamente, el fago eluido de cada genoteca puede mantenerse separado como una población genoteca-específica enriquecida de aglutinantes de la elastasa. Las poblaciones enriquecidas de fagos que exhiben péptidos de unión a la elastasa pueden cultivarse además por métodos estándares para rondas adicionales de tamizaje y/o para el análisis del péptido presentado en el fago y/o para la secuenciación del ADN que codifica el péptido de unión exhibido.
40

Uno de los protocolos de tamizaje alternativo posible usa las moléculas objetivo de la elastasa que son biotiniladas y que pueden capturar por la unión a estreptavidina, por ejemplo, recubiertas en partículas.

45 El fago recuperado se puede amplificar después por la infección de las células bacterianas, y el proceso de tamizaje puede repetirse con la nueva mezcla de fago que se agota ahora en aglutinantes de no-elastasa y aglutinantes enriquecidos en elastasa. La recuperación aun de algunos fagos de unión puede ser suficiente para llevar el proceso hasta su terminación. Después de algunas rondas de selección, se determinan por métodos convencionales las secuencias génicas que codifican las porciones de unión derivadas de los clones de fagos seleccionados de la mezcla de unión, revelando la secuencia del péptido que le imparte afinidad de unión al fago por el objetivo. Un aumento en el número de fagos recuperados después de cada ronda de selección y la recuperación de las secuencias estrechamente relacionadas indican que el tamizaje está convergiendo en las secuencias de la genoteca que tienen una característica deseada.
50

55 Después que se identifica un conjunto de polipéptidos de unión, la información de la secuencia se puede usar para diseñar otras bibliotecas secundarias. Por ejemplo, las bibliotecas secundarias pueden explorar con más detalle un espacio de segmento de secuencia más pequeño que la genoteca inicial. En algunas modalidades, la genoteca secundaria incluye proteínas que están sesgadas en miembros con propiedades deseadas adicionales, por ejemplo, secuencias que tienen una alta identidad de porcentaje a una proteína humana.
60

La tecnología de exhibición se puede usar además para obtener polipéptidos que son específicos a epítomos particulares de un objetivo. Esto se puede hacer, por ejemplo, mediante el uso de moléculas de competencia no-objetivos que carecen del epítomo en particular, o están mutados dentro del epítomo, por ejemplo, con alanina. Tales moléculas no-objetivo se pueden usar en un procedimiento de selección negativa como se describe más abajo,

como moléculas de competencia al unir una genoteca de exhibición al objetivo, o como un agente de pre-elución, por ejemplo, para capturar en una genoteca de exhibición que se disocia en la solución de lavado.

5 **Selección Iterativa.** En una modalidad preferida, la tecnología de genoteca de exhibición se usa de un modo iterativo. Una primera genoteca de exhibición se usa para identificar una o más proteínas que interactúan con un objetivo. Estas proteínas identificadas se variaron después, mediante el uso de un método de mutagénesis para formar una segunda genoteca de exhibición. Las proteínas de mayor afinidad se seleccionan después de la segunda genoteca, por ejemplo, mediante el uso de mayor rigurosidad o condiciones de unión y de lavado más competitivas.

10 En algunas implementaciones, la mutagénesis se dirige a las regiones conocidas o tienen probabilidad de estar en la interfase de unión. Algunas técnicas de mutagénesis ilustrativas incluyen: PCR propensa a errores (Leung y otros (1989) *Technique* 1:11-15), recombinación, transposición de ADN usando escisión aleatoria (Stemmer (1994) *Nature* 389:391; llamada "transposición de ácido nucleico"), RACHITT™ (Coco y otros (2001) *Nature Biotech.* 19:354), mutagénesis sitio dirigida (Zoller y otros (1987) *Nucl Acids Res* 10:6487-6504), mutagénesis por inserción de un casete (Reidhaar-Olson (1991) *Methods Enzymol.* 208:564-586) e incorporación de oligonucleótidos redundantes (Griffiths y otros (1994) *EMBO J* 13:3245). Para los dominios de Kunitz, se conocen muchas posiciones cerca de la interfase de unión. Tales posiciones incluyen, por ejemplo, las posiciones 13, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 34, y 39 con respecto a la secuencia de BPTI. (de acuerdo con la numeración de BPTI en U.S. 6,333,402). Tales posiciones pueden mantenerse constantes y otras posiciones se pueden variar o estas posiciones pueden variarse a sí mismas.

20 En un ejemplo de selección iterativa, los métodos descritos en la presente se usan para identificar primero las proteínas de una genoteca de exhibición que unen una elastasa con al menos una especificidad de unión mínima a un objetivo o una actividad mínima, por ejemplo, una constante de disociación de equilibrio para la unión de mayor que 1 nM, 10 nM, o 100 nM. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas iniciales identificadas se usan como un ácido nucleico molde en la introducción de variaciones, por ejemplo, para identificar a un segundo ligando de proteína que tiene propiedades mejoradas (por ejemplo, afinidad de unión, cinética, o estabilidad) en relación con el ligando de la proteína inicial.

25 **Selección de velocidad.** Dado que una velocidad de disociación lenta puede ser predictiva de alta afinidad, particularmente con respecto a las interacciones entre las proteínas y sus objetivos, los métodos descritos en la presente descripción se pueden usar para aislar proteínas con una velocidad de disociación cinética deseada (es decir reducida) para una interacción de unión con un objetivo.

30 Para seleccionar las proteínas de disociación lenta de una genoteca de exhibición, la genoteca se pone en contacto con un objetivo inmovilizado, por ejemplo, la elastasa inmovilizada. El objetivo inmovilizado se lava después con una primera solución que elimina las biomoléculas no-específicamente o débilmente unidas. Después el objetivo inmovilizado se eluye con una segunda solución que incluye una cantidad saturada del objetivo libre, es decir, réplicas del objetivo que no están unidos a la partícula. El objetivo libre se une a las biomoléculas que se disocian del objetivo. La unión reiterada se previene eficazmente con la cantidad saturada del objetivo libre con respecto a la concentración muy inferior del objetivo inmovilizado.

35 La segunda solución puede tener condiciones de solución que son sustancialmente fisiológicas o que son muy rigurosas. Típicamente, las condiciones de solución de la segunda solución son idénticas a las condiciones de solución de la primera solución. Las fracciones de la segunda solución se recogen en orden temporal para distinguir las fracciones iniciales de las finales. Las fracciones finales incluyen biomoléculas que se disocian a una velocidad más lenta del objetivo que las biomoléculas en las fracciones iniciales.

40 Más aun, es posible además recuperar los miembros de la genoteca de exhibición que permanecen unidos al objetivo, incluso después de una incubación prolongada. Estos pueden ya sea disociarse usando condiciones caotrópicas o se pueden amplificar mientras se unen al objetivo. Por ejemplo, el fago unido al objetivo puede ponerse en contacto con las células bacterianas.

45 **Selección o Tamizaje de especificación.** Los métodos de tamizaje de la genoteca de exhibición descritos en la presente pueden incluir un proceso de selección o tamizaje que descarta los miembros de la genoteca de exhibición que se unen a una molécula no objetivo, por ejemplo, una proteasa distinta de la elastasa, tal como tripsina. En una modalidad, la molécula no objetivo es la elastasa que se ha activado por tratamiento con un inhibidor unido irreversiblemente, por ejemplo, un inhibidor covalente.

50 En una implementación, una etapa denominada "selección negativa" o "reducción" se usa para discriminar entre el objetivo y unas moléculas no-objetivo relacionadas, pero distintas o unas no-relacionadas. La genoteca de exhibición o una mezcla de esta se pone en contacto con la molécula no-objetivo. Los miembros de la muestra que no se unen a la molécula no-objetivo se recogen y usan en las selecciones posteriores para la unión a la molécula objetivo o incluso para selecciones negativas posteriores. La etapa de selección negativa puede ser antes o después de seleccionar los miembros de la genoteca que se unen a la molécula objetivo.

65

En otra implementación, se usa una etapa de tamizaje. Después que los miembros de la genoteca de exhibición se aíslan por la unión a la molécula objetivo, cada miembro de la genoteca aislado se prueba en su capacidad de unirse a una molécula no-objetivo (por ejemplo, una no-objetivo mencionada anteriormente). Por ejemplo, un tamiz de ELISA de alto rendimiento puede usarse para obtener estos datos. El tamiz de ELISA puede usarse además para obtener los datos cuantitativos de la unión de cada miembro de la genoteca al objetivo. Los datos de unión no-objetivo y objetivo se comparan (por ejemplo, el uso de una computadora y programa) para identificar a los miembros de la genoteca que se unen específicamente al objetivo.

Modificación y variación de polipéptidos

Es posible además variar una proteína descrita en la presente descripción para obtener la variante de proteína útil que tiene propiedades similares o mejoradas o alteradas. Típicamente, un número de variantes son posibles. Una variante se puede preparar y probar después, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de unión descrito en la presente descripción (tales como anisotropía de fluorescencia).

Un tipo de variante es un truncamiento de un ligando descrito en la presente descripción o aislado por un método descrito en la presente descripción. En este ejemplo, la variante se prepara eliminando uno o más residuos de aminoácidos del ligando a partir del N o C terminal. En algunos casos, una serie de tales variantes se prepara y prueba. La información de las pruebas de la serie se usa para determinar una región del ligando que sea esencial para la unión de la proteína elastasa. Una serie de deleciones o inserciones internas pueden ser construidas y probadas del mismo modo. Para los dominios de Kunitz, puede ser posible eliminar, por ejemplo, entre uno y cinco residuos o uno y tres residuos que son N-terminal en C₅, la primera cisteína, y entre uno y cinco residuos o uno y tres residuos que son C-terminal en C₅₅, la cisteína final, en donde cada una de las cisteínas corresponde a una cisteína respectivamente numerada en BPTI.

Otro tipo de variante es una sustitución. En un ejemplo, el ligando se somete al barrido con alanina para identificar los residuos que contribuyen a la actividad de unión. En otro ejemplo, se construyó una genoteca de sustituciones en una o más posiciones. La genoteca puede ser no sesgada o, particularmente si múltiples posiciones son variadas, puede ser sesgada hacia un residuo inicial. En algunos casos, las sustituciones son todas sustituciones conservadoras.

Otro tipo de variante incluye uno o más aminoácidos de origen no natural. Tales variantes de ligandos pueden producirse por síntesis o modificación química. Una o más posiciones pueden sustituirse con un aminoácido de origen no natural. En algunos casos, el aminoácido sustituido puede estar químicamente relacionado con el residuo original de origen natural (por ejemplo, alifático, cargado, básico, ácido, aromático, hidrófilo) o un isómero del residuo inicial.

Puede ser posible además incluir enlaces no peptídicos y otras modificaciones químicas. Por ejemplo, parte o todo el ligando puede sintetizarse como un peptidomimético, por ejemplo, un peptoide (Ver, por ejemplo, Simon y otros (1992) Proc. Natl. Acad. Sciences. USA 89:9367-71 y Horwell (1995) Trends Biotechnol. 13:132-4). Ver además otras modificaciones discutidas más abajo.

Caracterización de las interacciones de unión

Las propiedades de unión de una proteína (por ejemplo, un polipéptido que incluye un dominio de Kunitz) se pueden evaluar fácilmente usando diversos formatos de ensayo. Por ejemplo, la propiedad de unión de una proteína se puede medir en solución por anisotropía de fluorescencia, que proporciona un método conveniente y preciso para determinar una constante de disociación (K_D) o constante de asociación (K_a) de la proteína para un objetivo en particular. En uno de tales procedimientos, la proteína que se evalúa se marca con fluoresceína. La proteína marcada con fluoresceína se mezcla en los pocillos de una placa de ensayo de múltiples pocillos con diferentes concentraciones del objetivo en particular (por ejemplo, elastasa). Las mediciones de anisotropía de fluorescencia se llevan a cabo mediante el uso de un lector de placa de polarización por fluorescencia.

ELISA. Las interacciones de unión pueden analizarse además mediante el uso de un ensayo ELISA. Por ejemplo, la proteína que se evalúa se pone en contacto en una placa de microtitulación cuya superficie inferior se ha recubierto con el objetivo, por ejemplo, una cantidad limitante del objetivo. La molécula se pone en contacto con la placa. La placa se lava con tampón para eliminar las moléculas que no se unen específicamente. Después, la cantidad de la proteína unida a la placa se determina mediante el sondeo de la placa con un anticuerpo que reconoce la proteína. Por ejemplo, la proteína puede incluir una etiqueta de epítipo. El anticuerpo puede enlazarse a una enzima tal como fosfatasa alcalina, que produce un producto colorimétrico cuando se proporcionan los sustratos apropiados. En el caso donde un miembro de la genoteca de exhibición incluye la proteína a ser probada, el anticuerpo puede reconocer una región que es constante entre todos los miembros de la genoteca de exhibición, por ejemplo, para un miembro de genoteca de exhibición en fagos, una proteína principal del recubrimiento del fago.

Ensayos homogéneos. Un interacción de unión entre una proteína y un objetivo en particular se pueden analizar mediante el uso de un ensayo homogéneo, es decir, después de que se añaden todos los componentes del ensayo, no se necesitan manipulaciones con fluido adicional. Por ejemplo, la transferencia de energía de fluorescencia (FET) puede usarse como un ensayo homogéneo (ver, por ejemplo, Lakowicz y otros, patente de Estados Unidos núm. 5,631,169; Stavrianopoulos, y otros, patente de Estados Unidos núm. 4,868,103). Una etiqueta fluoróforo en la primera molécula (por ejemplo, la molécula identificada en la fracción) se selecciona tal que su energía fluorescente emitida se puede absorber por un marcador fluorescente en una segunda molécula (por ejemplo, el objetivo) si la segunda molécula está en la proximidad de la primera molécula. La etiqueta fluorescente en la segunda molécula fluoresce cuando absorbe en la energía transferida. Dado que la eficiencia de transferencia de energía entre las etiquetas se relaciona con la distancia que separa las moléculas, la relación espacial entre las moléculas se puede evaluar. En una situación en la que se produce la unión entre las moléculas, la emisión fluorescente de la etiqueta de la molécula 'aceptor' en el ensayo debe ser máxima. Un evento de unión FET se puede medir convenientemente a través de los medios de detección fluorométrica estándares bien conocidos en la técnica (por ejemplo, usando un fluorímetro). Titulando la cantidad de la primera o segunda molécula de unión, se puede generar una curva de unión para estimar la constante de unión de equilibrio.

Resonancia en superficie de plasmón (SPR). Una interacción de unión entre una proteína y un objetivo en particular se puede analizar usando la SPR. Por ejemplo, después de la secuenciación de un miembro de la genoteca de exhibición presente en una muestra, y, opcionalmente verificado, por ejemplo, mediante ELISA, la proteína exhibida se puede producir en cantidad y ensayar para la unión al objetivo usando la SPR. La SPR o análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA) detecta las interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes (por ejemplo, BIAcore). Los cambios de la masa en la superficie de unión (indicativos de un evento de unión) de la matriz de BIA da lugar a alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial (SPR)). Los cambios en la refractividad generan una señal detectable, que se mide como una indicación de las reacciones en tiempo real entre las moléculas biológicas. Los métodos para usar SPR se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 5,641,640; Raether (1988) Surface Plasmons Springer Verlag; Sjolander, S. y Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345; Szabo y otros (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705.

La información de la SPR se puede usar para proporcionar una medida precisa y cuantitativa de la constante de disociación de equilibrio (K_d), y parámetros cinéticos, que incluyen k_{on} y k_{off} , para la unión de una biomolécula a un objetivo. Tales datos se pueden usar para comparar diferentes biomoléculas. Por ejemplo, proteínas seleccionadas a partir de una genoteca de exhibición se pueden comparar para identificar individuos que tienen una alta afinidad por el objetivo o que tienen k_{off} lenta. Esta información puede usarse además para desarrollar la relación estructura-actividad (SAR) si las biomoléculas están relacionados. Por ejemplo, si las proteínas son todas variantes mutadas de un único anticuerpo parental o un conjunto de anticuerpos parentales conocidos, las variantes de aminoácidos se pueden identificar en posiciones dadas que se correlacionan con parámetros de unión particulares, por ejemplo, alta afinidad y k_{off} lenta.

Otros métodos para medir afinidades de unión incluyen polarización de fluorescencia (FP) (Ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos núm. 5,800,989), resonancia magnética nuclear (NMR), y valoraciones de unión (por ejemplo, usando transferencia de energía de fluorescencia).

Otras medidas de solución para estudiar las propiedades de unión incluyen la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y RMN.

Caracterización de la inhibición de la elastasa

Con respecto a las modalidades en las que el compuesto incluye un polipéptido que tiene un dominio de Kunitz específico para la elastasa, pueden ser útiles para caracterizar la capacidad del polipéptido para inhibir la elastasa.

Los dominios de Kunitz se pueden tamizar para la unión a la elastasa y para la inhibición de la actividad proteolítica de la elastasa. Los dominios de Kunitz se pueden seleccionar por su potencia y selectividad de inhibición de la elastasa. En un ejemplo, la elastasa y su sustrato se combinan bajo condiciones de ensayo que permiten la reacción de la proteasa con su sustrato. El ensayo se realiza en ausencia del dominio de Kunitz, y en presencia de concentraciones crecientes del dominio de Kunitz. La concentración del compuesto de prueba en la que el 50% de la actividad de la elastasa se inhibe por el compuesto de prueba es el valor de CI_{50} (Concentración Inhibidora) o valor de CE_{50} (Concentración Eficaz) para ese compuesto. Dentro de una serie o grupo de dominio de Kunitz, los que tienen valores inferiores de CI_{50} o CE_{50} se consideran inhibidores más potentes de la elastasa que los compuestos que tienen valores mayores de CI_{50} o CE_{50} . Los compuestos preferidos de acuerdo con este aspecto tienen un valor de CI_{50} de 100 nM o menos, según medido en un ensayo *in vitro* para la inhibición de la actividad de la elastasa.

El dominio de Kunitz se puede evaluar después para la selectividad hacia la elastasa. Un compuesto de prueba se ensaya para su potencia hacia un panel de serina proteasas y otras enzimas y un valor de CI_{50} se determina para cada péptido. Un dominio de Kunitz que demuestra un valor de CI_{50} bajo para la enzima elastasa, y un valor mayor

de CI_{50} para otras enzimas dentro del panel de prueba (por ejemplo, tripsina, plasmina, calicreína), se considera que sea selectivo a la elastasa. Generalmente, un compuesto se considera selectivo si su valor de CI_{50} es al menos un orden de magnitud menos que el próximo valor más pequeño de CI_{50} medido en el panel de enzimas.

5 Los métodos específicos para evaluar la inhibición de la elastasa se describen en el Ejemplo más abajo.

Es posible además evaluar la actividad in vivo del dominio de Kunitz o en muestras (por ejemplo, lavados pulmonares) de sujetos a los que se le administró un compuesto descrito en la presente descripción.

10 Objetivos de proteasas

Las proteasas están implicadas en una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo la inflamación y la lesión tisular. Las serina proteasas producidas por las células inflamatorias, incluyendo los neutrófilos, están implicados en diversos trastornos, tal como enfisema pulmonar. La elastasa de neutrófilos es una serina proteasa producida por los leucocitos polimorfonucleares con actividad frente a los componentes de la matriz extracelular y los patógenos. El enfisema pulmonar se caracteriza por la destrucción alveolar que conduce a un deterioro importante en la función pulmonar.

Una deficiencia de un inhibidor de serina proteasa, inhibidor $\alpha 1$ -proteasa (API, o $\alpha 1$ -PI, conocido antes como α -1 antitripsina) es un factor de riesgo para el desarrollo de enfisema pulmonar (Laurell, C. B. y Eriksson, S. (1963) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 15:132-140; Brantly, M. L., y otros (1988) Am. Rev. Respir. Dis. 138:327-336). La deficiencia de API puede conducir a la actividad incontrolada de la elastasa de neutrófilos y contribuir a la destrucción del tejido pulmonar en el enfisema pulmonar. Del mismo modo, la inactivación de API y la inflamación crónica puede conducir a un exceso de la actividad de la elastasa de neutrófilos y la destrucción patológica del tejido pulmonar.

La elastasa de neutrófilos humana consta de aproximadamente 218 residuos de aminoácidos, contiene 2 cadenas laterales de carbohidratos enlazados a la asparagina, y está unida entre sí por 2 enlaces disulfuro (Sinha, S., y otros Proc. Nat. Acad. Sciences. 84: 2228-2232, 1987). Se sintetiza normalmente como una proenzima en el neutrófilo en desarrollo pero se almacena en los gránulos primarios en su forma activa, preparados con actividad enzimática total cuando se liberan de los gránulos, normalmente en los sitios de inflamación (Gullberg U, y otros Eur J Haematol. 1997;58:137-153; Borregaard N, Cowland JB. Blood. 1997;89:3503-3521).

Otros objetivos ilustrativos de la proteasa incluyen: plasmina, calicreína, Factor VIIa, Factor XIa, trombina, uroquinasa, y Factor IIa. Las clases de proteasas relevantes incluyen: proteasas asociadas con la coagulación de la sangre, proteasas asociadas con el complemento, proteasas que digieren los componentes de la matriz extracelular, proteasas que digieren la membrana basal, y proteasas asociadas con las células endoteliales. Por ejemplo, la proteasa es una serina proteasa.

40 Producción de proteína

Producción de polipéptidos recombinantes. Los métodos recombinantes estándares de ácidos nucleicos se pueden usar para expresar un componente de polipéptido de un compuesto descrito en la presente descripción (por ejemplo, un polipéptido que incluye un dominio de Kunitz). Generalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido se clona en un vector de expresión de ácido nucleico. Si el polipéptido es suficientemente pequeño, por ejemplo, la proteína es un péptido de menos de 50 aminoácidos, la proteína se puede sintetizar mediante el uso de métodos sintéticos orgánicos automatizados.

El vector de expresión para expresar el polipéptido puede incluir un segmento que codifica el polipéptido y secuencias reguladoras, por ejemplo, un promotor, enlazado operativamente al segmento de codificación. Los vectores y promotores adecuados se conocen por aquellos con experiencia en la técnica y están comercialmente disponible para generar los constructos recombinantes de la presente invención. Ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ra Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001) y Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989).

Scopes (1994) Protein Purification: Principles and Practice, New York:Springer-Verlag y otros textos que proporcionan un número de métodos generales para purificar las proteínas recombinantes (y no-recombinantes).

60 *Producción de péptidos sintéticos.* El componente de polipéptido de un compuesto se puede producir además por medios sintéticos. Ver, por ejemplo, Merrifield (1963) J. Am. Chem.Soc., 85 : 2149. Por ejemplo, el peso molecular de los péptidos sintéticos o miméticos del péptido puede ser de aproximadamente 250 a aproximadamente 8,000 Daltons. Un péptido puede modificarse, por ejemplo, por la unión a una porción que aumenta el peso molecular efectivo del péptido. Si el péptido se oligomeriza, dimeriza y/o derivatiza, por ejemplo, con un polímero hidrófilo (por

ejemplo, para aumentar la afinidad y/o actividad de los péptidos), sus pesos moleculares pueden ser mayores y pueden estar en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 50,000 Daltons.

Composiciones farmacéuticas

Se presenta además una composición, por ejemplo, una composición farmacéuticamente aceptable, que incluye un dominio de Kunitz poli-PEGilado. En una modalidad, el dominio de Kunitz se une a una proteasa tal como elastasa, plasmina, o calicreína. Como se usa en la presente descripción, "composiciones farmacéuticas" abarca los compuestos (por ejemplo, compuestos etiquetados) para uso diagnóstico (por ejemplo, imágenes in vivo), así como compuestos para uso terapéutico o profiláctico.

Como se usa en la presente descripción, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos o que retardan la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. En una modalidad, el portador es distinto de agua. Preferentemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (*por ejemplo*, por inyección o infusión). En dependencia de la ruta de la administración, el compuesto activo se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que mantiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte ningún efecto toxicológico indeseado (*ver por ejemplo*, Berge, S.M., y otros (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición ácidas y sales de adición básicas. Las sales de adición ácidas incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como también a partir de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílico alifáticos, ácidos alcanoicos fenil sustituidos ácidos hidroxí alcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición básicas incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como también de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las usadas con anticuerpos para la administración de los humanos. El modo preferido de administración es parenteral (*por ejemplo*, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una modalidad preferida, el compuesto se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra modalidad preferida, el compuesto es administrado por inyección intramuscular o subcutánea.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usa en la presente se refiere a modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitarse a, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intrasternal e infusión.

Las composiciones farmacéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo condiciones de fabricación y almacenamiento. Una composición farmacéutica puede probarse además para asegurar que cumple con los estándares de regulación y de la industria para la administración. Por ejemplo, los niveles de endotoxina en la preparación se pueden probar mediante el uso del ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (por ejemplo, usando el kit de Bio Whittaker lote # 7L3790, sensibilidad de 0.125 EU/ml) de acuerdo con los métodos USP 24/NF 19. La esterilidad de composiciones farmacéuticas se pueden determinar usando medio tioglicolato de acuerdo con los métodos USP 24/NF 19. Por ejemplo, la preparación se usa para inocular el medio de tioglicolato e incubar a 35°C durante 14 o más días. El medio se inspecciona periódicamente para detectar el crecimiento de un microorganismo.

La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización con filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un portador estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución estéril de este previamente filtrada. La fluidez adecuada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, con el uso de un recubrimiento tal como lecitina,

mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión, y con el uso de surfactantes. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede producirse por la inclusión en la composición de un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

5 Los dominios de Kunitz poli-PEGilados descritos en la presente descripción pueden administrarse por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Para muchas aplicaciones, la vía/modo de administración es inyección intravenosa o infusión. Por ejemplo, para aplicaciones terapéuticas, el compuesto puede administrarse por infusión intravenosa a una velocidad de menos que 30, 20, 10, 5, o 1 mg/min para alcanzar una dosis de aproximadamente 1 a 100 mg/m² o 7 a 25 mg/m². La vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

10 En ciertas modalidades, el compuesto activo puede prepararse con un portador que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo los implantes, y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos. Ver, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978. La formulación farmacéutica es una técnica bien establecida, y se describe adicionalmente en Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20va ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel y otros, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7ma Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); y Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3ra ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

En ciertas modalidades, la composición puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) pueden incluirse además en una cápsula de gelatina de capa dura o blanda, comprimirse en tabletas, o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, el compuesto puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto mediante administración distinta a la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una modalidad preferida, una composición farmacéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos descritos en las patentes de Estados Unidos núms. 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824, o 4,596,556. Los ejemplos de implantes bien conocidos y módulos útiles en la presente invención incluyen: patente de Estados Unidos núm. 4,487,603, la que describe una bomba de micro-infusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; patente de Estados Unidos núm. 4,486,194, la que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; patente de Estados Unidos núm. 4,447,233, la que describe una bomba de infusión medicación para administrar la medicación a una velocidad precisa de infusión; patente de Estados Unidos núm. 4,447,224, la que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para suministro continuo de fármaco; patente de Estados Unidos núm. 4,439,196, la que describe un sistema osmótico de suministro de fármaco con compartimientos multi-cámaras; y patente de Estados Unidos núm. 4,475,196, la que describe un sistema osmótico de suministro de fármaco. Por supuesto, se conocen además muchos otros implantes de este tipo, sistemas y módulos de administración.

45 En ciertas modalidades, el compuesto puede formularse para asegurar la adecuada distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera sangre-cerebro (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que se transportan selectivamente en células u órganos específicos, mejorando así el suministro de fármaco dirigido (Ver, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685).

Se contemplan además los kits que comprenden el dominio de Kunitz poli-PEGilado e instrucciones de uso, por ejemplo, tratamiento, uso profiláctico, o de diagnóstico. En una modalidad, el kit incluye (a) el compuesto, por ejemplo, una composición que incluye el compuesto, y, opcionalmente, (b) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instructivo, comercial u otro material que se relaciona con los métodos descritos en la presente descripción y/o el uso del compuesto por los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, en el caso de un dominio de Kunitz que inhibe la actividad de la elastasa, el material informativo describe los métodos para administrar el compuesto que reduce la actividad de la elastasa o para tratar o prevenir un trastorno pulmonar (por ejemplo, CF o COPD), un trastorno inflamatorio (por ejemplo, IBD), o un trastorno caracterizado por la actividad elastasa excesiva.

En una modalidad, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar el compuesto de una manera adecuada, por ejemplo, en una dosis, forma de dosificación, o modo de administración adecuado (por ejemplo, una dosis, forma de dosificación, o modo de administración descrito en la presente descripción). En otra modalidad, el

material informativo puede incluir instrucciones para identificar un sujeto adecuado, por ejemplo, un humano, por ejemplo, un humano que tiene, o en riesgo de un trastorno caracterizado por la actividad elastasa excesiva. El material informativo puede incluir información sobre la producción del compuesto, peso molecular del compuesto, concentración, fecha de caducidad, información del lote o sitio de producción, y demás. El material informativo de los kits no se limita en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, instrucciones, se proporciona impresa, por ejemplo, un texto impreso, figura, y/o fotografía, por ejemplo, una etiqueta u hoja impresa. Sin embargo, el material informativo puede proporcionarse además en otros formatos, tales como Braille, material legible por computadora, grabación de vídeo, o grabación de audio. En otra modalidad, el material informativo del kit es una información de enlace o contacto, por ejemplo, una dirección física, dirección de correo electrónico, hipervínculo, sitio web, o número telefónico, donde un usuario del kit puede obtener información sustancial acerca del compuesto y/o su uso en los métodos descritos en la presente descripción. Por supuesto, el material informativo puede proporcionarse además en cualquier combinación de formatos.

Además del compuesto, la composición del kit puede incluir otros ingredientes, tales como un disolvente o tampón, un estabilizador o un conservante, y/o un segundo agente para tratar una afección o trastorno descrito en la presente descripción, por ejemplo, un trastorno pulmonar (por ejemplo, CF o COPD) o inflamatorio (por ejemplo, IBD o RA). Alternativamente, los otros ingredientes pueden incluirse en el kit, pero en diferentes composiciones o envases a las del compuesto. En tales modalidades, el kit puede incluir instrucciones para mezclar el compuesto y los otros ingredientes, o para usar el compuesto junto con los otros ingredientes.

El compuesto se puede proporcionar en cualquier forma, por ejemplo, forma líquida, polvo o liofilizado. Se prefiere que el compuesto sea sustancialmente puro y/o estéril. Cuando el compuesto se proporciona en una solución líquida, la solución líquida preferentemente es una solución acuosa, siendo preferida una solución acuosa estéril. Cuando el compuesto se proporciona como un polvo, la reconstitución generalmente es por la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, por ejemplo, agua o tampón estéril, opcionalmente puede proporcionarse en el kit.

El kit puede incluir uno o más envases para la composición que contiene el compuesto. En algunas modalidades, el kit contiene contenedores separados, divisiones o compartimentos para la composición y el material informativo. Por ejemplo, la composición puede estar contenida en una botella, frasco, o jeringa, y el material informativo puede estar contenido en una camisa o paquete de plástico. En otras modalidades, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un contenedor único, sin división. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, frasco o jeringa que tiene unido a la misma el material informativo en forma de una etiqueta. En algunas modalidades, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de contenedores individuales, cada uno contiene una o más formas de dosificación unitaria (por ejemplo, una forma de dosificación descrita en la presente descripción) del compuesto. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringas, ampulas, paquetes de lámina metálica, o paquetes blíster, cada uno contiene una única dosis unitaria del compuesto. Los contenedores de los kits pueden ser herméticos al aire, impermeables (por ejemplo, impermeable a los cambios de humedad o evaporación), y/o herméticos a la luz.

En una modalidad en donde el compuesto contiene un polipéptido que se une a una elastasa, las instrucciones para las aplicaciones de diagnóstico incluyen el uso del compuesto para detectar la elastasa, *in vitro*, por ejemplo, en una muestra, por ejemplo, una biopsia o células de un paciente que tiene un trastorno pulmonar, o *in vivo*. En otra modalidad, las instrucciones para aplicaciones terapéuticas incluyen sugerencias de dosificaciones y/o modos de administración en un paciente con un trastorno pulmonar. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, tal como un agente de diagnóstico o terapéutico, por ejemplo, un agente de diagnóstico o terapéutico tal como se describe en la presente descripción, y/o uno o más agentes adicionales para tratar la enfermedad pulmonar (por ejemplo, otro inhibidor de la elastasa), formulados como adecuados, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

50 Tratamientos

Un dominio de Kunitz poli-PEGilado tiene utilidades terapéuticas y profilácticas.

55 En una modalidad, el dominio de Kunitz poli-PEGilado inhibe una elastasa, por ejemplo, una elastasa de neutrófilos. El compuesto se puede administrar a un sujeto para tratar, prevenir, y/o diagnosticar una variedad de trastornos, tales como enfermedades caracterizadas por actividad indeseada o aberrante de la elastasa. Por ejemplo, la enfermedad o trastorno se pueden caracterizar por la actividad elastolítica aumentada de los neutrófilos. La enfermedad o trastorno puede resultar de una carga de neutrófilos aumentada en un tejido, por ejemplo, un tejido epitelial, tales como la superficie epitelial del pulmón. Por ejemplo, el polipéptido que inhibe la elastasa puede usarse para tratar o prevenir las enfermedades pulmonares tales como fibrosis quística (CF) o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), por ejemplo, enfisema. El compuesto se puede administrar además a células, tejidos, u órganos en cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*.

Los dominios de Kunitz poli-PEGilados que inhiben otras proteasas pueden usarse además para tratar o prevenir trastornos asociados con la actividad de otras proteasas respectivas.

5 Como se usa en la presente descripción, el término "tratar" o "tratamiento" se define como la aplicación o administración del dominio de Kunitz poli-PEGilado, solo o en conjunto con, un segundo agente a un sujeto, por ejemplo, un paciente, o la aplicación o administración del agente a un tejido o célula aislados, por ejemplo, línea celular, de un sujeto, por ejemplo, un paciente, que tiene un trastorno (por ejemplo, un trastorno como se describe en la presente descripción), un síntoma de un trastorno o una predisposición hacia un trastorno, con el propósito de curar, sanar, aliviar, calmar, alterar, remediar, perfeccionar, mejorar o afectar el trastorno, los síntomas del trastorno
10 o la predisposición hacia el trastorno. Tratar una célula se refiere a la inhibición, extirpación, muerte de una célula *in vitro* o *in vivo*, o de cualquier otra forma reducir la capacidad de una célula, por ejemplo, una célula aberrante, para mediar un trastorno, por ejemplo, un trastorno como se describe en la presente descripción (por ejemplo, un trastorno pulmonar). En una modalidad, "tratar una célula" se refiere a una reducción en la actividad y/o la proliferación de una célula, por ejemplo, un leucocito o neutrófilo. Tal reducción no indica necesariamente una
15 eliminación total de la célula, sino una reducción, por ejemplo, una reducción estadísticamente significativa, en la actividad o el número de la célula.

Como se usa en la presente, una cantidad de un dominio de Kunitz poli-PEGilado eficaz para tratar un trastorno, o una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto que es efectiva, tras la
20 administración de una dosis única o múltiple a un sujeto, para tratar un sujeto, por ejemplo, curar, aliviar, calmar o mejorar al menos un síntoma de un trastorno en un sujeto hasta un grado más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento. Por ejemplo, el trastorno puede ser un trastorno pulmonar, por ejemplo, un trastorno pulmonar descrito en la presente descripción.

25 Una "cantidad localmente eficaz" se refiere a la cantidad (por ejemplo, concentración) del compuesto que es eficaz en la actividad moduladora detectable de una proteína objetivo (por ejemplo, elastasa) en un tejido, por ejemplo, en una región del pulmón expuesta a la elastasa, o una célula productora de elastasa, tal como neutrófilos. La evidencia de la modulación puede incluir, por ejemplo, la cantidad aumentada de sustrato, por ejemplo, proteólisis reducida de la matriz extracelular.

30 Como se usa en la presente descripción, una cantidad de dominio de Kunitz poli-PEGilado eficaz para prevenir un trastorno, o un "una cantidad profilácticamente eficaz" del compuesto se refiere a una cantidad de un compuesto de unión a la elastasa, por ejemplo, un compuesto de polipéptido-polímero descrito en la presente descripción, que es eficaz, tras la administración de dosis única o múltiple al sujeto, lo que previene o retrasa la ocurrencia de la
35 aparición o recurrencia de un trastorno, por ejemplo, un trastorno pulmonar.

Los términos "inducir," "inhibir," "potenciar," "elevar," "aumentar," "disminuir" o similares, por ejemplo, que denotan diferencias cuantitativas entre dos estados, se refieren a una diferencia de, por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa (por ejemplo, $P < 0.05$, 0.02 , o 0.005), entre dos estados.

40 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un único bolo se puede administrar varias dosis divididas pueden administrarse en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa
45 en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias de los sujetos que se tratan; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

50 Un intervalo ilustrativo, no-limitante para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un compuesto descrito en la presente descripción es 0.1-20 mg/kg, con mayor preferencia 1-10 mg/kg. El compuesto se puede administrar por infusión intravenosa a una velocidad de menos de 20, 10, 5, o 1 mg/min hasta alcanzar una dosis de aproximadamente 1 a 50 mg/m² o aproximadamente 5 a 20 mg/m². Es de señalar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto en
55 particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en la presente descripción son sólo ilustrativos.

60 Una composición farmacéutica puede incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un compuesto descrito en la presente descripción, por ejemplo, un compuesto que incluye un polipéptido que se une e inhibe una proteasa (por ejemplo, elastasa). Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesario, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del compuesto de inducir
65 una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es además una en la que cualquiera

de los efectos tóxicos o perjudiciales de la composición es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "dosis terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente un parámetro medible, por ejemplo, un aumento en la función pulmonar, en relación con sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir un parámetro medible puede evaluarse en un sistema de modelo animal de eficacia predictiva en un trastorno humano. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir, tal inhibición *in vitro* por ensayos conocidos por el experto, por ejemplo, un ensayo descrito en la presente descripción.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesario, para lograr el resultado profiláctico conveniente. Típicamente, dado que una dosis profiláctica se usa en los sujetos antes o en una fase más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz puede ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" pretende incluir animales humanos y no humanos. El término "animales no humanos" de la invención incluye todos los vertebrados, por ejemplo, no mamíferos (tales como pollos, anfibios, reptiles) y mamíferos, tales como primates no humanos, oveja, perro, vaca, cerdo, etc.

En una modalidad, el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero no humano que expresa un elastasa de neutrófilos humana o una proteína endógena de la elastasa de neutrófilos no humana o un antígeno tipo-elastasa como para que un compuesto de unión a la elastasa reaccione de forma cruzada. Un compuesto de la invención se pueden administrar a un sujeto humano para fines terapéuticos (discutidos adicionalmente más abajo). Además, un compuesto de unión a la elastasa puede administrarse a un mamífero no humano que expresa el antígeno tipo-elastasa al que se une el compuesto (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) para fines veterinarios o como un modelo animal de la enfermedad humana. Referente a los últimos, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica del compuesto (por ejemplo, pruebas de dosificaciones y cinéticas de administración).

El método sujeto se puede usar en células en cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*. El método se puede realizar en las células presentes en un sujeto, como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico). En modalidades *in vivo*, la etapa de contacto se realiza en un sujeto e incluye administrar el compuesto de unión a la elastasa al sujeto bajo condiciones eficaces para permitir la unión del compuesto a un objetivo (por ejemplo, una elastasa) en el sujeto.

Los compuestos que inhiben la elastasa pueden reducir la degradación mediada por elastasa y sus secuelas, tales como infección persistente e inflamación, lo que conduce a la destrucción del tejido (por ejemplo, destrucción del epitelio de las vías respiratorias).

Los métodos de administración de compuestos se describen en "Composiciones Farmacéuticas". Las dosis adecuadas de los compuestos usados dependerán de la edad y peso del sujeto y del fármaco usado en particular. Los compuestos se pueden usar como agentes competitivos para inhibir, reducir una interacción indeseable, por ejemplo, entre un agente natural o patológico y la elastasa, por ejemplo, entre la matriz extracelular y la elastasa.

En una modalidad, los compuestos se usan para matar o extirpar células que expresan la elastasa *in vivo*. Los compuestos se pueden usar por sí mismos o conjugarse con un agente, por ejemplo, un fármaco citotóxico, radioisótopo. Este método incluye: administrar el compuesto solo o unido a un fármaco citotóxico, para un sujeto que requiere tal tratamiento.

Los términos "agente citotóxico" y "agente citostático" se refieren a agentes que tienen la propiedad de inhibir el crecimiento o proliferación (por ejemplo, un agente citostático), o inducir la muerte de las células.

El dominio de Kunitz poli-PEGilado puede usarse además para suministrar una variedad de fármacos, incluyendo fármacos terapéuticos, un compuesto que emite radiación, moléculas de plantas, hongos, o de origen bacteriano, proteínas biológicas, y mezclas de estos. Por ejemplo, el dominio de Kunitz puede usarse para dirigir la carga a una región de un sujeto que incluye una proteasa que interacciona específicamente con el dominio de Kunitz.

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de estos se ejemplifican por el fragmento de la toxina A de la difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de la difteria, exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modicina A, α -sacrina, ciertas proteínas de *Aleurites fordii*, ciertas proteínas de Diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAP, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Morodica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogilina, restrictocina, fenomicina y enomicina. Los procedimientos para la preparación de los polipéptidos enzimáticamente activos de las inmunotoxinas se describen en WO 84/03508 y WO 85/03508. Los ejemplos de porciones citotóxicas que se pueden conjugar con los anticuerpos incluyen adriamicina, clorambucil, daunomicina, metotrexato, neocarzinostatina, y platino.

En el caso de toxinas polipeptídicas, las técnicas de ácidos nucleicos recombinantes se pueden usar para construir un ácido nucleico que codifica el polipéptido que incluye un dominio de Kunitz y la citotoxina (o un componente de polipéptido de esta) como fusiones traduccionales. El ácido nucleico recombinante se expresa después, expresado, por ejemplo, en las células y aísla el polipéptido de fusión codificado. Después, la proteína de fusión se asocia físicamente con una porción que aumenta el peso molecular del compuesto, por ejemplo, para estabilizar la media vida in vivo, y se une después a una porción (por ejemplo, un polímero).

Los procedimientos para conjugar las proteínas con los agentes citotóxicos se han descrito anteriormente. Para conjugar el clorambucil con proteínas, ver, por ejemplo, Flechner (1973) *European Journal of Cancer*, 9:741-745; Ghose y otros (1972) *British Medical Journal*, 3:495-499; y Szekerke, y otros (1972) *Neoplasma*, 19:211-215. Para la conjugación de daunomicina y adriamicina con las proteínas, ver, por ejemplo, Hurwitz, E. y otros (1975) *Cancer Research*, 35:1175-1181 y Arnon y otros (1982) *Cancer Surveys*, 1:429-449. Para preparar conjugados de proteína-ricina, ver, por ejemplo, U.S. 4,414,148 y Osawa, T., y otros (1982) *Cancer Surveys*, 1:373-388 y las referencias citadas en la misma. Los procedimientos de acoplamiento se describen además en EP 226 419.

Se describe además un método para matar o extirpar que implica el uso del compuesto para la profilaxis. Por ejemplo, estos materiales se pueden usar para prevenir o retardar el desarrollo o progresión de una enfermedad pulmonar.

El uso de los métodos terapéuticos de la presente invención para tratar enfermedades pulmonares tiene una serie de beneficios. Dado que la porción de polipéptido del compuesto reconoce específicamente la elastasa, otro tejido se ahorra y altos niveles del agente se suministran directamente al sitio donde se requiere la terapia. El tratamiento de acuerdo con la presente invención se puede controlar eficazmente con los parámetros clínicos. Alternativamente, estos parámetros se pueden usar para indicar cuándo se debe emplear tal tratamiento.

Trastornos pulmonares y métodos y formulaciones

Los polipéptidos inhibidores de hNE que se asocian físicamente con una porción (por ejemplo, un polímero) pueden usarse para tratar trastornos pulmonares tales como enfisema, fibrosis quística, COPD, bronquitis, hipertensión pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda, enfermedad pulmonar intersticial, asma, intoxicación por humo, displasia broncopulmonar, neumonía, lesión térmica, y rechazo al trasplante de pulmón.

Fibrosis quística. La fibrosis quística (CF) es una enfermedad genética que afecta aproximadamente 30,000 niños y adultos en los Estados Unidos. Un defecto en el gen CF causa al cuerpo producir un moco anormalmente espeso, pegajoso que obstruye los pulmones y conduce a infecciones pulmonares que amenazan la vida. Un diagnóstico para el trastorno genético incluye una prueba de sudor que puede incluir la medición de la concentración de cloruro en sudor recogido en gasa o papel de filtro, medición de la concentración de sodio en el sudor recogido en gasa o papel de filtro, y el suministro de pilocarpina y densidad de corriente en la recogida de sudor. El gen que causa la CF ha sido identificado y se conocen un número de mutaciones en el gen.

En una modalidad, un polipéptido inhibidor de hNE que se asocia físicamente con una porción (por ejemplo, un polímero) se usa para mejorar al menos un síntoma de CF, por ejemplo, para reducir las lesiones pulmonares en los pulmones de un paciente CF.

Este compuesto puede usarse además para mejorar al menos un síntoma de una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). El enfisema, junto con la bronquitis crónica, es parte de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). Es una enfermedad pulmonar grave y es progresiva, por lo general ocurre en los pacientes de edad avanzada. COPD causa el exceso de la inflamación de las estructuras en los pulmones conocidas como alvéolos o sacos de aire. Las paredes de los alvéolos se rompen dando como resultado una disminución en la capacidad respiratoria de los pulmones. Los pacientes con esta enfermedad pueden experimentar primero dificultad para respirar y tos. Un índice clínico para evaluar la COPD es el índice destructivo que evalúa una medida del daño alveolar septal y enfisema, y se ha propuesto como un índice sensible de la destrucción pulmonar que refleja estrechamente las anomalías funcionales, especialmente la pérdida de retroceso elástico. Ver, por ejemplo, *Am Rev Respir Dis* 1991 Jul;144(1):156-9. El compuesto puede usarse para reducir el índice destructivo en un paciente, por ejemplo, una cantidad estadísticamente significativa, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, o 40% o al menos dentro de 50, 40, 30, o 20% de lo normal de un individuo de la edad y género correspondiente.

En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un dominio de Kunitz poli-PEGilado como se define en las reivindicaciones que es un inhibidor de hNE para el tratamiento de un trastorno pulmonar (por ejemplo, fibrosis quística, COPD). La composición puede formularse para la inhalación u otro modo de administración pulmonar. Como consecuencia, los compuestos descritos en la presente descripción pueden administrarse por inhalación al tejido pulmonar. El término "tejido pulmonar" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier tejido del tracto respiratorio e incluye tanto el tracto respiratorio superior como inferior, excepto donde se indique de cualquier otra forma. Un polipéptido inhibidor de hNE que se asocia físicamente con una

porción (por ejemplo, un polímero) puede administrarse en combinación con una o más de las modalidades existentes para el tratamiento de enfermedades pulmonares.

5 En un ejemplo el compuesto se formula para un nebulizador. En una modalidad, el compuesto puede almacenarse en forma liofilizada (por ejemplo, a temperatura ambiente) y reconstituirse en solución antes de la inhalación. En otra modalidad, el compuesto se almacena a un pH ácido (por ejemplo, un pH menos de 5, 4, o 3) y se combinan después con un tampón de neutralización que tiene un pH básico antes de la inhalación.

10 Es posible además formular el compuesto para la inhalación mediante el uso de un dispositivo médico, por ejemplo, un inhalador. Ver, por ejemplo, U.S. 6,102,035 (un inhalador de polvo) y 6,012,454 (un inhalador de polvo seco). El inhalador puede incluir compartimientos separados para el compuesto activo a un pH ácido y el tampón de neutralización y un mecanismo para combinar el compuesto con un tampón de neutralización inmediatamente antes de la atomización. En una modalidad, el inhalador es un inhalador de dosis medida.

15 Los tres sistemas comunes usados para suministrar fármacos localmente a los pasajes pulmonares de aire incluyen inhaladores de polvo seco (DPIs), inhaladores de dosis medidas (MDIs) y nebulizadores. Los MDIs, el método más popular de administración por inhalación, pueden usarse para suministrar medicamentos en una forma solubilizada o como una dispersión. Típicamente los MDIs comprenden un Freón u otro propelente de presión de vapor relativamente alta que fuerza a la medicación en forma de aerosol en el tracto respiratorio tras la activación del dispositivo. A diferencia de los MDIs, los DPIs generalmente se basan completamente en los esfuerzos inspiratorios del paciente para introducir un medicamento en forma de polvo seco a los pulmones. Los nebulizadores forman un aerosol del medicamento que se inhala impartiendo energía a una solución líquida. Además se ha explorado el suministro pulmonar directo de fármacos durante la ventilación líquida o lavado pulmonar usando un medio fluoroquímico. Estos y otros métodos pueden usarse para suministrar un polipéptido inhibidor de hNE que se asocia físicamente con una porción (por ejemplo, un polímero).

20 Por ejemplo, para la administración por inhalación, el dominio de Kunitz poli-PEGilado que inhibe hNE se suministra en forma de un atomizador de aerosol a partir de un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, o un nebulizador. El compuesto puede estar en forma de una partícula seca o como un líquido. Las partículas que incluyen el compuesto pueden prepararse, por ejemplo, por secado por aspersión, por secado de una solución acuosa del dominio de Kunitz poli-PEGilado que inhibe hNE con un agente de neutralización de carga y crear partículas después de polvo seco o por secado de una solución acuosa en un modificador orgánico y crear partículas después de polvo seco.

35 El compuesto puede suministrarse convenientemente en forma de una presentación de atomizador de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diellorotetrafluoroctiano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para entregar un cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos para el uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo del dominio de Kunitz poli-PEGilado que inhibe hNE y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón, si la partícula es una partícula formulada. Adicionalmente al compuesto formulado o sin formular, otros materiales tales como 100% de DPPC u otros surfactantes pueden mezclarse con el dominio de Kunitz poli-PEGilado que inhiben hNE para promover el suministro y dispersión del compuesto formulado o sin formular. Los métodos para preparar partículas secas se describen, por ejemplo, en la Publicación PCT WO 02/32406.

40 El dominio de Kunitz poli-PEGilado que inhibe hNE, por ejemplo, como partículas de aerosol secas, cuando se administra puede ser rápidamente absorbida y puede producir un resultado terapéutico local o sistémico rápido. La administración puede ajustarse para proporcionar actividad detectable dentro de 2 minutos, 5 minutos, 1 hora, o 3 horas de la administración. En algunas modalidades, el pico de actividad puede lograrse incluso más rápidamente, por ejemplo, dentro de una media hora o incluso dentro de diez minutos. Como alternativa, puede formularse un dominio de Kunitz poli-PEGilado que inhibe hNE de vida media biológica más larga que puede usarse como una alternativa a otros modos de administración, por ejemplo, tal que el compuesto entra en la circulación desde el pulmón y se distribuye a otros órganos o a un órgano objetivo particular.

55 En una modalidad, el dominio de Kunitz poli-PEGilado que inhibe hNE se suministra en una cantidad tal que al menos 5 % de la masa del polipéptido se suministra al tracto respiratorio inferior o el pulmón profundo. El pulmón profundo tiene una red capilar extremadamente rica. La membrana respiratoria que separa el lumen capilar del espacio de aire alveolar es muy delgada ($\approx 6 \mu\text{m}$) y extremadamente permeable. Adicionalmente, la capa de líquido que recubre la superficie alveolar es rica en surfactantes pulmonares. En otras modalidades, al menos 2%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, u 80% de la composición de un dominio de Kunitz poli-PEGilado que inhibe hNE se suministra en el tracto respiratorio inferior o al pulmón profundo. El suministro a cualquiera o ambos de estos tejidos resulta en una absorción eficaz del compuesto y alta biodisponibilidad. En una modalidad, el compuesto se proporciona en una dosis medida mediante el uso de, por ejemplo, un inhalador o nebulizador. Por ejemplo, el

compuesto se suministra en una forma de dosificación unitaria al menos aproximadamente 0.02, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10, 20, 40, o 50 mg/puff o más.

5 El porcentaje de biodisponibilidad puede calcularse como sigue: el porcentaje de biodisponibilidad = $(AUC_{no-invasiva}/AUC_{i.v. \text{ o s.c.}}) \times (dosis_{i.v. \text{ o s.c.}}/dosis_{no-invasiva}) \times 100$.

10 Aunque no es necesario, los potenciadores de suministro tales como surfactantes pueden usarse para mejorar además el suministro pulmonar. Un "surfactante" como se usa en la presente descripción, se refiere a un compuesto que tiene una porción hidrofílica y lipofílica, que promueve la absorción de un fármaco por la interacción con una interface entre dos fases inmiscibles. Los surfactantes son útiles en las partículas secas por varias razones, por ejemplo, reducción de la aglomeración de las partículas, reducción de la fagocitosis de macrófagos, etc. Cuando se combina con el surfactante pulmonar, se puede lograr una absorción más eficiente del compuesto porque los surfactantes, tales como DPPC, facilitarán en gran medida la difusión del compuesto. Los surfactantes se conocen bien en la técnica e incluyen pero sin limitarse a fosfoglicéridos, por ejemplo, fosfatidilcolinas, L-alfa-fosfatidilcolina dipalmitoil (DPPC) y difosfatidil glicerina (DPPG); hexadecanol; ácidos grasos; polietilenglicol (PEG); polioxietileno-9-; aúril éter; ácido palmítico; ácido oléico; trioleato de sorbitán (Span 85); glicocolato; surfactina; poloxámero; éster de ácido graso sorbitán; trioleato de sorbitán; tiloxapol; y fosfolípidos.

20 IBD y sus Métodos y Formulaciones

En una modalidad, un dominio de Kunitz poli-PEGilado que inhibe hNE se usa para mejorar al menos un síntoma de una enfermedad inflamatoria del intestino, por ejemplo, colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn.

25 Las enfermedades inflamatorias del intestino (IBD) son generalmente inflamación intestinal recurrente, crónica. IBD se refiere a dos trastornos distintos, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa (UC). Ambas enfermedades pueden incluir ya sea una respuesta inmune mal regulada a los antígenos del tracto GI, una violación de la barrera mucosa, y/o una reacción inflamatoria adversa a una infección intestinal persistente (ver, por ejemplo, MacDermott, R. P., J Gastroenterology, 31:907-916 (1996)).

30 En los pacientes con IBD, úlceras e inflamación del revestimiento interno de los intestinos conducen a síntomas de dolor abdominal, diarrea y sangrado rectal. La colitis ulcerativa ocurre en el intestino grueso, mientras que en la enfermedad de Crohn, la enfermedad puede involucrar el tracto GI completo así como los intestinos delgado y grueso. Para la mayoría de los pacientes, IBD es una afección crónica con síntomas que duran por meses a años. Los síntomas clínicos de la IBD son sangrado intermitente rectal, dolor abdominal tipo cólico, pérdida de peso y diarrea. El diagnóstico de la IBD se basa en los síntomas clínicos, el uso de un enema de bario, pero la visualización directa (sigmoidoscopia o colonoscopia) es la prueba más precisa.

40 Los síntomas de IBD incluyen, por ejemplo, dolor abdominal, diarrea, sangrado rectal, pérdida de peso, fiebre, pérdida de apetito, y otras complicaciones más graves, tales como la deshidratación, anemia y desnutrición. Un número de estos síntomas están sujetos a análisis cuantitativo (por ejemplo, pérdida de peso, fiebre, anemia, etc.). Algunos síntomas se determinan fácilmente a partir de un prueba de sangre (por ejemplo, anemia) o una prueba que detecta la presencia de sangre (por ejemplo, sangrado rectal). Un índice clínico puede usarse además para controlar la IBD, tal como el Índice de Actividad Clínica para la colitis ulcerativa. Ver además, por ejemplo, Walmsley y otros Gut. 1998 Jul;43(1):29-32 y Jowett y otros (2003) Scand J Gastroenterol. 38(2):164-71.

45 En una modalidad, la administración del compuesto a un sujeto que tiene o predispuesto a tener colitis ulcerativa causa mejora del índice, por ejemplo, un cambio estadísticamente significativo en el índice. El compuesto incluye el polipéptido inhibidor de hNE que se asocia físicamente con una porción (por ejemplo, un polímero hidrófilo)

50 En una modalidad, la administración del compuesto a un sujeto que tiene o predispuesto a tener IBD causa mejora de al menos un síntoma de IBD.

55 La enfermedad de Crohn, una enfermedad inflamatoria idiopática del intestino, se caracteriza por la inflamación crónica en diversos sitios en el tracto gastrointestinal. Si bien la enfermedad de Crohn afecta más comúnmente el íleon distal y el colon, puede manifestarse en cualquier parte del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano y el área perianal. El pronóstico y diagnóstico de la enfermedad de Crohn puede medirse usando un índice clínico, por ejemplo Índice de la Actividad de la Enfermedad de Crohn. Ver, por ejemplo, American Journal of Natural Medicine, Julio/Ago 1997, y Best WR, y otros, "Development of a Crohn's disease activity index." Gastroenterology 70:439-444, 1976. En una modalidad, la administración del compuesto a un sujeto que tiene o predispuesto a tener la enfermedad de Crohn causa mejora del índice, por ejemplo, un cambio estadísticamente significativo en el índice, o mejora de al menos un síntoma de la enfermedad de Crohn.

60 Como consecuencia se proporciona además una composición que incluye el dominio de Kunitz poli-PEGilado que inhibe hNE para el tratamiento de una enfermedad intestinal (por ejemplo, una colitis tales como colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn o IBP) u otra enfermedad gastrointestinal o rectal. La composición puede formularse como un

65

supositorio. Los supositorios pueden formularse con ingredientes base tales como ceras, aceites, y alcoholes grasos con características para quedarse en estado sólido a temperatura ambiente y fusionarse a temperaturas corporales. Los ingredientes activos de esta invención con o sin ingredientes terapéuticos opcionales, como hidrocortisona (1.0%), anestésicos tópicos, tales como la benzocaína (1.0 a 6.0%) u otros como los ya enumerados pueden prepararse a valores de pH adecuados, por ejemplo alcoholes grasos líquidos pH 5, tales como alcohol oleil (intervalo 45% a 65%) o alcoholes grasos superiores sólidos como alcohol cetílico o estearílico (30% a 50%). Los ingredientes base se conocen bien en la técnica de esta industria. Ver, por ejemplo, U.S. 4,945,084 y 5,196,405.

La composición puede usarse además como un ingrediente activo en cremas, lociones, pomadas, aerosoles, almohadillas, parches, enemas, espumas y supositorios y otros o en vehículos de suministro tales como microencapsulación en liposomas o glicosferas. Otras tecnologías de suministro incluyen microesponjas o membrana celular sustituta (Completech™) que atrapan los ingredientes activos para tanto protección como para la liberación más lenta. Espumas rectales pueden prepararse como composiciones de aerosol tópicas puede ser usado además, por ejemplo, para tratar (colitis ulcerativa, colitis de Crohn, y otros).

Usos diagnósticos

Un dominio de Kunitz poli-PEGilado tiene utilidades diagnósticas.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método de diagnóstico para detectar *in vitro* la presencia de una proteína elastasa, (por ejemplo, una muestra biológica, tal como tejido, biopsia o *in vivo* (por ejemplo, imagenología *in vivo* en un sujeto). El método incluye: (i) contactar una muestra con un dominio de Kunitz poli-PEGilado, por ejemplo, un dominio de Kunitz que se une a una proteasa objetivo, por ejemplo, elastasa, plasmina, o calicreína, y (ii) detectar la formación de un complejo entre el ligando de elastasa y la muestra. El método puede incluir contactar una muestra de referencia (por ejemplo, un muestra control) con el ligando, y determinar el grado de formación del complejo entre el ligando y la muestra en relación con el mismo para la muestra de referencia. Un cambio, por ejemplo, un cambio estadísticamente significativo, en la formación del complejo en la muestra o sujeto con respecto a la muestra control o sujeto puede ser indicativo de la presencia de la elastasa en la muestra.

Otro método incluye: (i) administrar el compuesto a un sujeto y (iii) detectar la formación de un complejo entre el compuesto y la proteasa objetivo. La detección puede incluir determinar la ubicación o tiempo de formación del complejo.

El compuesto se puede marcar directamente o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos.

La formación del complejo entre el compuesto y la proteasa objetivo puede detectarse por la medición o visualización ya sea del ligando unido a la proteasa objetivo o ligando no unido. Los ensayos de detección convencionales pueden usarse, por ejemplo, unos ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejidos. Además de marcar el compuesto, la presencia de la proteasa objetivo puede ensayarse en una muestra mediante un inmunoensayo de competición utilizando estándares marcados con una sustancia detectable y un ligando no marcado de la proteasa. En un ejemplo de este ensayo, la muestra biológica, los estándares marcados y el compuesto se combinan y se determina la cantidad de estándar marcado unido al ligando no marcado. La cantidad de proteasa objetivo en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad del estándar marcado unido al compuesto.

Ligandos de proteína marcados con fluoróforo y cromóforo pueden prepararse. Una variedad de fluoróforos y cromóforos adecuados se describen por Stryer (1968) Science, 162:526 y Brand, L. y otros (1972) Annual Review of Biochemistry, 41:843-868. Los ligandos de proteína pueden marcarse con grupos cromóforos fluorescentes por procedimientos convencionales tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos núms. 3,940,475, 4,289,747, y 4,376,110. Un grupo de fluoróforos que tienen un número de propiedades deseables descritas anteriormente son los colorantes de xanteno, que incluyen las fluoresceínas y rodaminas. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilaminas. Una vez marcado con un fluoróforo o cromóforo, el ligando de proteína puede usarse para detectar la presencia o localización de una proteasa objetivo en una muestra, por ejemplo, mediante el uso del microscopio fluorescente (tal como, microscopio confocal o con deconvolución).

Matrices de Proteína El compuesto puede inmovilizarse además en una matriz de proteína. La matriz de proteína puede usarse como una herramienta de diagnóstico, por ejemplo, para tamizar muestras médicas (tales como células aisladas, sangre, suero, biopsias, y similares). Los métodos para producir matrices de polipéptidos se describen, por ejemplo, anteriormente.

Imagenología In vivo Todavía en otra modalidad, la descripción proporciona un método para detectar la presencia de una proteasa objetivo o un tejido que expresa la proteasa objetivo *in vivo*. El método incluye (i) administrar a un sujeto (por ejemplo, un paciente que tiene un trastorno pulmonar o respiratorio) un compuesto que incluye un

dominio de Kunitz y que es poliPEGilado, conjugado con un marcador detectable; (ii) exponer al sujeto a un medio para detectar dicho marcador detectable a los tejidos o células que expresan la proteasa objetivo. Por ejemplo, se visualiza el sujeto, por ejemplo, mediante NMR u otros medios tomográficos.

5 Ejemplos de marcadores útiles para la imagenología de diagnóstico, de acuerdo con la presente invención incluyen marcadores radiactivos tales como ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{125}I , ^3H , ^{14}C , y ^{188}Rh , marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, marcadores activos de resonancia magnética nuclear, positrones que emiten isótopos detectables mediante un escáner de tomografía por emisión de positrones ("PET"), quimioluminiscentes tales como luciferina, y marcadores enzimáticos tales como peroxidasa o fosfatasa. Emisores de radiación de corto alcance, tales como isótopos detectables por sondas detectoras de corto alcance además pueden emplearse. El compuesto que incluye el dominio de Kunitz puede marcarse con tales reactivos usando técnicas conocidas. Por ejemplo, ver Wensel y Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, Nueva York para las técnicas relacionadas con el radiomarcado de proteínas y D. Colcher y otros (1986) *Meth. Enzymol.* 121: 802-816.

10 Un compuesto radiomarcado de esta invención puede usarse para las pruebas diagnóstico *in vitro*. La actividad específica de un compuesto marcado isotópicamente depende de la vida media, la pureza isotópica del marcador radiactivo, y cómo se incorpora el marcador en el compuesto.

15 Los procedimientos para el marcaje de polipéptidos (por ejemplo, la porción polipéptido del compuesto) con los isótopos radioactivos (tales como ^{14}C , ^3H , ^{35}S , ^{125}I , ^{32}P , ^{131}I) son generalmente conocidos. Por ejemplo, procedimientos de marcaje de tritio se describen en la patente de Estados Unidos núm. 4,302,438. Los procedimientos de marcaje por yodación, marcaje con tritio, y ^{35}S , por ejemplo, según se adapta para los anticuerpos monoclonales murinos, se describen, por ejemplo, por Goding, J.W. (*Monoclonal antibodies: principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology* 2.a ed. Londres; Orlando: Academic Press, 1986. pp 124-126) y las referencias citadas en la misma. Otros procedimientos para la yodación de polipéptidos, se describen por Hunter y Greenwood (1962) *Nature* 144:945, David y otros (1974) *Biochemistry* 13:1014-1021, y las patentes de Estados Unidos núms. 3,867,517 y 4,376,110. Elementos de radiomarcaje que son útiles en imagenología incluyen por ejemplo ^{123}I , ^{131}I , ^{111}In , y $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Los procedimientos para la yodación de polipéptidos se describen por Greenwood, F. y otros (1963) *Biochem. J.* 89:114-123; Marchalonis, J. (1969) *Biochem. J.* 113:299-305; y Morrison, M. y otros (1971) *Immunochemistry* 289-297. Los procedimientos para el marcaje con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se describen por Rhodes, B. y otros en Burchiel, S. y otros (eds.), *Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer*, Nueva York: Masson 111-123 (1982) y las referencias citadas en la misma. Los procedimientos adecuados para el marcaje de anticuerpos con ^{111}In se describen por Hnatowich, D.J. y otros (1983) *J. Immunol. Methods*, 65:147-157, Hnatowich, D. y otros (1984) *J. Applied Radiation*, 35:554-557, y Buckley, R. G. y otros (1984) *F.E.B.S.* 166:202-204.

20 En el caso de un compuesto radiomarcado, el compuesto se administra al paciente, se localiza en el tejido el antígeno con el que el compuesto interactúa, y se detecta o "visualiza" *in vivo* usando técnicas conocidas tales como escaneo radionuclear mediante el uso de, por ejemplo, una cámara gamma o la tomografía por emisión. Ver por ejemplo, A.R. Bradwell y otros, "Developments in Antibody Imaging", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin y otros, (eds.), pp 65-85 (Academic Press 1985). Como alternativa, un escáner de tomografía transaxial por emisión de positrones, tal como Pet VI designado situado en el Laboratorio Nacional Brookhaven, puede usarse cuando el marcador radiactivo emite positrones (por ejemplo, ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , and ^{13}N).

25 **Agentes de contraste de MRI** Imagen por Resonancia Magnética (MRI) usa NMR para visualizar las características internas del sujeto viviente, y es útil para el pronóstico, diagnóstico, tratamiento y cirugía. MRI puede usarse sin compuestos trazadores radiactivos para beneficio obvio. Algunas técnicas de MRI se resumen en EP-A-0 502 814. Generalmente, las diferencias relacionadas con las constantes de tiempo de relajación T1 y T2 de los protones del agua en diferentes entornos se usan para generar una imagen. Sin embargo, estas diferencias pueden ser insuficientes para proporcionar imágenes intensas de alta resolución.

30 Las diferencias en estas constantes de tiempo de relajación pueden mejorarse mediante agentes de contraste. Ejemplos de tales agentes de contraste incluyen un número de agentes magnéticos agentes paramagnéticos (que alteran principalmente T1) y ferromagnético o superparamagnético (que alteran principalmente respuesta T2). Los quelatos (por ejemplo, quelatos EDTA, DTPA y NTA) pueden usarse para unir (y reducir la toxicidad) de algunas sustancias paramagnéticas (por ejemplo, Fe^{+3} , Mn^{+2} , Gd^{+3}). Otros agentes pueden estar en forma de partículas, por ejemplo, menores que $10\ \mu\text{m}$ a aproximadamente $10\ \text{nM}$ de diámetro). Las partículas pueden tener propiedades ferromagnéticas, antiferromagnéticas o superparamagnéticas. Las partículas pueden incluir, por ejemplo, magnetita (Fe_3O_4), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ferritas, y otros compuestos minerales magnéticos de elementos de transición. Las partículas magnéticas pueden incluir: uno o más cristales magnéticos con y sin material normagnético. El material normagnético puede incluir polímeros sintéticos o naturales (tales como sefarsa, dextrano, dextrina, almidón y similares).

Los compuestos pueden marcarse además con un grupo que indica que contiene el NMR-átomo ^{19}F activo o una pluralidad de tales átomos en tanto como (i) substancialmente todos los de átomos de flúor naturalmente abundantes son del isótopo ^{19}F y, así, substancialmente todos los compuestos que contienen flúor son NMR-activo, (ii) muchos compuestos polifluorados químicamente activos tales como anhídrido trifluoroacético están disponibles comercialmente en un costo relativamente bajo, y (iii) muchos compuestos fluorados se han encontrado médicamente aceptable para el uso en humanos, tales como los poliéteres perfluorados utilizados para portar oxígeno como sustitutos de hemoglobina. Después de permitir tal tiempo para la incubación, se lleva a cabo una MRI del cuerpo completo mediante el uso de un aparato tal como uno de aquellos descritos por Pykett (1982) Scientific American, 246:78-88 para localizar y visualizar tejidos cancerosos.

Se contemplan además kits que comprenden el compuesto que se une a una proteasa objetivo e instrucciones de uso, por ejemplo, el uso del compuesto (por ejemplo, dominio de Kunitz poli-PEGilado) para detectar la proteasa objetivo, *in vitro*, por ejemplo, en una muestra, por ejemplo, una biopsia o células de un paciente que tiene un trastorno pulmonar, o por ejemplo, por imagenología de un sujeto *in vivo*. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, tal como un marcador o agente de diagnóstico adicional. Para uso *in vivo* el compuesto puede formularse como una composición farmacéutica.

Una secuencia ilustrativa de amino ácido de una elastasa de neutrófilos humanos:

(Enumerado además en el GenBank® bajo: gij4503549|ref|NP_001963.1| elastasa 2, neutrófilo [Homo sapiens])

**MTLGRRLAQLFLACVLPALLGGTALASEIVGRRARPHAWPFMVSLQLRGGHFCGATLIAPNFVMSAAH
CVANVNVRAVRVVLGAHNSRREPTRQVFAVQRI FENGYDPVLLNDIVILQLNGSATINANVQVAQLPA
QRRRLNGVQCLAMGWLLGRNRGIASVLQELNVTVVTSLCRRSNVCTLVGRQAGVCFGDSGSPLVCSG
LIHGIASFVRGGCASGLYPDAFAPVAQFVNWIDSIIQRSEDNPCPHPRDPPASRTH (sec. con núm. de ident.: 22)**

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente aspectos de la invención:

Ejemplo

Los péptidos y proteínas pequeñas se aclaran rápidamente de la circulación *in vivo*. El rápido aclaramiento frecuentemente limita mucho la potencia terapéutica. Las dosis altas y administración frecuente se necesitan para lograr efectos terapéuticos.

DX-890 consiste de 56 aminoácidos, contiene tres enlaces disulfuro intramoleculares, y tiene un peso molecular de 6,237 Da. Para el acoplamiento de la base amina primaria, hay cinco sitios potenciales de PEGilación en DX-890, cada uno de los cuatro residuos lisina y el N-terminal. El uso de ácido propiónico succinimidilo mPEG puede usarse para acoplar PEG a cada uno de estos sitios, por ejemplo, en cuatro residuos lisina y al N-terminal. El reactivo de PEG que puede usarse puede ser mPEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5 kDa.

La reacción puede dejarse proceder hasta la finalización a un pH que permite la modificación de los grupos amino en las cadenas laterales lisina y el N-terminal. Por ejemplo, el pH puede ser mayor que 7.5, por ejemplo, entre 7.8 y 8.5. La reacción se apaga, por ejemplo, con Tris. La reacción puede ser cargada en una columna de intercambio iónico o exclusión por tamaño y se recogen las fracciones que contienen DX-890 PEGilado. Estas fracciones relevantes pueden dializarse, purificarse además, y después almacenarse o analizarse.

DX-1000, un inhibidor de plasmina humano, es un dominio de Kunitz con menos lisinas que DX-890. Tiene unas tres lisinas disponibles y un N-terminal para la modificación con mPEG. DX-1000 puede combinarse con un reactivo de ácido propiónico succinimidil mPEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5 kDa o 7 kDa. DX-1000 puede modificarse y purificarse, por ejemplo, como se describe para DX-890. US 6,103,499 describe además otros inhibidores de plasmina, que incluyen inhibidores relacionados con DX-1000. Los dominio de Kunitz con secuencias o que conforman los motivos descritos en US 6,103,499 pueden modificarse como se describe en la presente descripción.

DX-88, un inhibidor de la calicreína es un dominio de Kunitz con menos lisinas que DX-890. Tiene unas tres lisinas disponibles y un N-terminal para la modificación con mPEG. DX-88 puede combinarse con un reactivo de ácido propiónico succinimidil mPEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5 kDa o 7 kDa. DX-88 puede modificarse y purificarse, por ejemplo, como se describió para DX-890. US 6,333,402 describe además otros inhibidores de calicreína, que incluyen inhibidores relacionados con DX-88. Ver, por ejemplo, Tablas 6 y 103 descritas en la misma. Los dominio de Kunitz con secuencias o que conforman los motivos descritos en US 6,333,402 pueden modificarse como se describe en la presente descripción.

Las estructuras previstas o presentes de DX-890, DX-88 y DX-1000 se muestran con los residuos lisina que se indican en la FIG. 1, 2, y 3, respectivamente.

Ejemplo

El ejemplo anterior es además detallado por los siguientes métodos para PEGilar una proteína de interés en múltiples o todos los sitios reactivos posibles, en las siguientes implementaciones, el método se usa para dominios de Kunitz poli-PEGilado en múltiples o todas las posibles aminas primarias.

Un PEG monofuncional amino-reactivo de 5 kDa (mPEG-SPA) de NEKTAR Therapeutics (catálogo núm.: 2M4M0H01) se usó como material de las reacciones de PEGilación.

Hemos encontrado que es posible poli-PEGilar DX-88, DX-890 y DX-1000 con cuatro o cinco PEGs de 5 kDa. Además, las proteínas poli-PEGiladas mantienen la actividad terapéutica deseada, mientras que tienen vida media circulante aumentada. Además, las condiciones de reacción fueron muy eficientes en términos de conversión de la proteína no modificada a la forma pegilada deseada. Las reacciones pueden usarse o aumentar de escala, para proporcionar consistentemente preparaciones homogéneas de producto poli-PEGilado. Debido a esta gran eficacia y pocos productos secundarios de reacción, las preparaciones de los productos poli-PEGilados pueden sintetizarse con mayor rendimiento y menor costo que el dominio de Kunitz que incluye una sola porción de PEG. Este enfoque hace la fabricación más fácil con consistencia lote a lote más controlada y un producto final que es más fácil de caracterizar completamente.

20 Materiales

- mPEG-SPA, MW 5,000 Da, NEKTAR Therapeutics, cat. núm.: 2M4M0H01 (succinimidil éster de ácido polietilenglicol propiónico cubierto con metoxi)
- DX-88 API, MW 7,054 Da, ~10 mg/ml en PBS, pH 7.0
- DX-890 API, MW 6,231 Da, ~10 mg/ml en 10mM NaAc, pH 3.0
- DX-1000 API, MW 7,167 Da, ~10 mg/ml en PBS, pH 7.0
- 0.2-0.3M Hepes, pH 7.8-8.5
- 1M Tris, pH 8.0
- HCl 1N

30 Reacción de PEGilación I:

1. Calcular la cantidad de PEG necesario para reaccionar el polipéptido de dominio de Kunitz en aproximadamente relación molar 10:1 de PEG:grupo reactivo. Por ejemplo, DX-890 tiene 5 grupos reactivos totales, por lo que se usa una relación molar 50:1 de PEG:DX-890. Dependiendo del polipéptido de dominio de Kunitz y/o condiciones de reacción, se usa típicamente una relación de 25:1 a 50:1. Por ejemplo, se podría usar para la PEGilación 10 mg de DX-890 (PM 6,231 Da) en una relación molar 50:1 de PEG:péptido, 401 mg de PEG (PM 5,000 Da).

2. Justo antes de reaccionar el polipéptido de dominio de Kunitz con el PEG, diluir el volumen requerido de polipéptido concentrado de dominio de Kunitz 1:1 con 0.2 M Hepes, tampón de pH 7.8 a 8.5. El péptido madre es típicamente ~10.0 mg/ml. Por lo tanto tras la dilución, la concentración del polipéptido de dominio de Kunitz es ~ 5.0 mg/ml en tampón 0.1M Hepes, pH 7.8-8.5. Tanto DX-88 como DX-1000 son relativamente estables en términos de solubilidad tras la dilución. DX-890, mientras es inicialmente soluble tras la dilución, sin embargo, puede precipitar en el tiempo. Los tiempos de reacción puede elegirse para minimizar la precipitación.

3. Inmediatamente añadir la solución de polipéptido de dominio de Kunitz diluida 1:1 directamente al polvo de PEG y disolver rápidamente el PEG mediante agitación con vortex. Una vez disuelto completamente, tapar el tubo, envolver en papel de aluminio y dejar reaccionar mientras que oscila/gira lentamente por 2.5 -3 horas de 2-8 °C a 25 °C.

4. Apagar la reacción adicionando 1/9^{no}. volumen de 1 M Tris, pH 8.0 por 30-60 minutos a 2-8°C hasta 25°C mientras que oscila/gira lentamente.

5. Con cuidado y poco a poco ajustar el pH de la mezcla de reacción de enfriamiento a ~ pH 7 con pequeñas adiciones de HCl 1 N mientras se mezcla.

6. La reacción neutralizada puede almacenarse de 2-8 °C, o congelarse de -20 °C a -80 °C hasta la purificación.

La adición directa de solución del polipéptido de dominio de Kunitz al polvo PEG puede ayudar a simplificar el número de etapas en el proceso de reacción y reducir la hidrólisis antes de la reacción.

60 Reacción de PEGilación II:

El siguiente es otro método para la poli-PEGilación de un polipéptido.

1. PEG se pesa, como se ha descrito para la Reacción I, y se coloca a un lado para el uso justo antes de la reacción.

2. Diluir el polipéptido de dominio de Kunitz a 3-5 mg/ml en 0.3 M de Hepes, pH 7.8-8.5
3. Justo antes de la reacción, preparar rápidamente una solución de 200-250 mg/ml de PEG (en ligero exceso) en dH₂O que ha sido desgasificado previamente y N₂-saturado. Añadir el agua al PEG y disolver de forma rápida y completamente por agitación con vortex.
- 5 4. Inmediatamente añadir el volumen necesario de solución de PEG a la solución de polipéptido de dominio de Kunitz mientras se mezclan. Tapar el tubo, envolver en papel de aluminio y dejar reaccionar mientras que oscila/gira lentamente por 2.5-3 horas de 2-8C a 25C.
5. Continuar con las etapas 4) a la 6) citadas anteriormente.

10 Ejemplo: Métodos analíticos

Los dominio de Kunitz modificados pueden analizarse y caracterizarse por una variedad de métodos. Los métodos ilustrativos incluyen los siguientes:

- 15 La mezcla de reacción sin purificar puede analizarse para el grado de PEGilación por ambos análisis SDS-PAGE reductor/no reductor con tinción tanto con Coomassie como con yodo como se describe en un protocolo separado y la cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) controlando tanto del índice de refracción (RI) como la absorbancia a 280 nm (UV). El análisis de SDS-PAGE por tinción con Coomassie detecta sólo el componente de polipéptido de la mezcla de reacción (libre y unida), mientras que la
- 20 tinción con yodo preferentemente detecta el PEG (libre y acoplado). Análisis SEC-HPLC por UV (abs. 280 nm) detecta el péptido (libre y acoplado) y RI detecta tanto péptido como PEG. La detección por dispersión de luz dinámica (LS) permite la determinación de MW absoluto y la distribución de MW.

- 25 SDS-PAGE y SEC-HPLC pueden mostrar la distribución de los productos PEGilados, pero los pesos moleculares absolutos deben ser determinados por MALDI-TOF u otros métodos. La razón es que las proteínas pegiladas corren más lentamente en los geles y SEC-HPLC que lo que hacen las proteínas no pegiladas, debido al radio hidrodinámico grande de las porciones de PEG, conduciendo a una sobreestimación del peso molecular. Esto podría superarse usando dominios de Kunitz PEGilado de peso molecular absoluto conocido como estándares.

30 *Tintura de yodo*

- Los geles se cargan con aproximadamente 2-3 µg de proteína inicialmente (para DX-1000, DX-88, y DX-890) para las muestras PEGiladas que se resolverán en solamente una o dos bandas. Esta carga es la más frecuentemente adecuada para las reacciones de proteínas PEG 25:1 y 50:1 si el acoplamiento tuvo éxito. Sin embargo, para las
- 35 muestras que se pegilaron en proporciones de reacción inferiores (1:1, 5:1, y 10:1) y se espera exhiben múltiples especies pegiladas, es más adecuado 10-15 µg de proteína por carril (ya que pueden aparecer 4-5 bandas). Las muestras se mezclan con la cantidad adecuada de tampón de muestra NuPAGE LDS. Las muestras se agitan y calientan a 70 °C por 10 minutos antes cargar.

- 40 Los geles pueden prepararse y resolverse de acuerdo con métodos estándar, por ejemplo, mediante el uso del sistema Invitrogen NuPAGE con unos geles 4-12% Bis-Tris. Ver, por ejemplo, NuPAGE Novex Bis-Tris Gels Quick Reference Card, Invitrogen Life Technologies.

- 45 Los geles se enjuagan brevemente en agua deionizada, después se cubren con una solución de cloruro de bario al 5% por 10 minutos en el agitador. El gel se enjuaga de nuevo con agua deionizada y se sumerge después en una solución de yodo 0.1 N por al menos 10 minutos en el agitador. Las bandas deben ser visible casi de inmediato La tinción total se completará después de 10 minutos. El gel se fotografía después, por ejemplo con UVP Epi Chem II Darkroom y el filtro de bromuro de etidio.

- 50 Después de la tinción con yodo, la proteína puede teñirse para las proteínas con Coomassie. El gel se enjuaga primero en agua para desteñir se mezcla después con Coomassie y se destiñe después en 300 ml de metanol, 100 ml de ácido acético glacial, y 600 ml de agua. Las bandas de proteína no pegilada aparecen azul oscuro, y la proteína pegilada pueden aparecer azul muy claro, en todo caso.

55 *Cromatografía*

- El sistema de cromatografía (Waters Corporation) usado aquí fue el sistema 600 (bomba/controlador) de software EMPOWER™ funcionamiento con 717 más muestreador automático, 996 detector de matriz de fotodiodos (PDA) y 2414 detector de índice de refracción. Adicionalmente, un PD2010+ detector dinámico de dispersión de la luz (LS) (Detectores de Precisión, Inc.) se corrió además en serie.
- 60

La cromatografía en columna SEC puede incluir las siguientes características: columna SEC: TSK G3000SW_{x1} (7.8 mm ID x 30 cm L) con precolumna (Tosoh Bioscience, catálogo núm.: 08541 y 08543); Velocidad de flujo: 0.5 ml/minuto; Tiempo de corrida: 35 minutos; Fase móvil: PBS, pH 7.2 con 0.05% NaN₃.; Volumen de inyección de la

muestra: 25 - 100 µl; Carga de la muestra: 50-100 µg por inyección; Detección: UV (280 nm), RI y LS; Estándares SEC : BioRad, catálogo núm.: 151-1901

MALDI-TOF

5 Espectrometría de Masas (ABI, de Applied Biosystems Voyager-DE) MALDI-TOF (desorción ionización mediante láser asistida por matriz -tiempo de vuelo) puede usarse para evaluar la masa real de los productos de reacción y sujetos. Para el análisis de polipéptido (por ejemplo, antes de la reacción), ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico puede usarse como una matriz. Para el análisis de los productos de la reacción o especies poli-PEGiladas, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) puede usarse como una matriz. Chips se pueden puntear 1:1 (0.5 µl:0.5 µl) de la muestra: matriz, y secar al aire antes del análisis.

Medición de Ki

15 Las constantes de inhibición de equilibrio (Ki) para una proteína poli-PEGilada (por ejemplo, un DX-890 poli-PEGilado) puede determinarse de acuerdo con el modelo de inhibición de unión fuerte con la formación de un complejo reversible (estequiometría 1:1). Las reacciones se ajustan con 100 pM de enzima (por ejemplo, elastasa) y un intervalo de concentraciones del inhibidor (0-4 nM) a 30 °C en 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, y 0.1 % de Triton X-100. A continuación de una incubación de 24 h, se añade el sustrato (25 µM) a la solución de enzima-inhibidor y la velocidad de hidrólisis del sustrato se controla a una excitación de 360 nm y una emisión de 460 nm. Los gráficos del porcentaje de actividad remanente en función de la concentración de inhibidor activo se ajustan mediante análisis de regresión no lineal a la Ecuación 1 para determinar las constantes de disociación de equilibrio. La proteína no modificada y la proteína poli-PEGilada pueden analizarse para la comparación.

$$\%A = 100 - \left(\frac{(I + E + K_i) - \sqrt{(I + E + K_i)^2 - 4 \cdot E \cdot I}}{2 \cdot E} \right) \cdot 100$$

Ecuación 1

donde:

- %A = porcentaje actividad
- I = concentración de la proteína dominio de Kunitz (por ejemplo, DX-890)
- E = concentración de la enzima (por ejemplo, HNE)
- K_i = constante de inhibición de equilibrio

Farmacocinética en Animales

35 Los siguientes métodos pueden usarse para evaluar la farmacocinética (PK) de proteínas tales como proteínas poli-PEGiladas en animales, por ejemplo, ratones y conejos.

40 La proteína que se prueba se marca con yodo (¹²⁵I) usando el método del yodógeno (Pierce). El tubo de reacción se enjuagó con el tampón de reacción (25 mM Tris, 0.4 M NaCl, pH 7.5). El tubo se vacía y reemplaza después con 0.1 ml de tampón de reacción y 12 µl de portador libre de yodo-126, aproximadamente 1.6 mCi. Después de seis minutos, el yodo activado se transfiere a un tubo que contiene la proteína que se prueba. Después de nueve minutos, la reacción se termina con 25 µl de solución de tirosina saturada. La reacción puede purificarse en una columna 6000 de poliacrilamida D-sal de 5 ml en Tris/NaCl. HSA puede usarse para minimizar la adhesividad al gel.

45 Un número suficiente de ratones (aproximadamente 36) se obtienen. Se registró el peso de cada animal. En el caso de los ratones, los animales se inyectan en la vena de la cola con aproximadamente 5 µg de la proteína que se prueba. Las muestras se recuperan en cada intervalo de tiempo por animal, con cuatro animales por intervalo de tiempo, a aproximadamente 0, 7, 15, 30, y 90 minutos, 4 horas, 8 horas, 16 horas, y 24 horas post-inyección. Las muestras (aproximadamente 0.5 ml) se recogen en anticoagulante (0.02 ml de EDTA). Las células se centrifugan y se separan a partir de plasma/suero. Las muestras pueden analizarse mediante conteo de la radiación y la columna de péptido SEC en HPLC con detección de radiación en línea.

50 Para los conejos, el material se inyecta en la vena de la oreja Las muestras se recogen a 0, 7, 15, 30, 90 minutos, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 120, y 144 horas post-inyección. Las muestras se recogen y analizan como para los ratones.

55 Los datos pueden estar en forma de una curva de desintegración bi-exponencial (ecuación 2) o una tri-exponencial (ecuación 3) que describe las fases de aclaramiento *in vivo* "rápida", "lenta", y "más lenta" :

Ecuación 2 $y = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$

Ecuación 3 $y = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Ce^{-\gamma t}$

donde:

y = Cantidad de marcador que queda en el plasma en el tiempo = t post-administración

A = Marcador total en la fase de aclaramiento "rápida"

B = Marcador total en la fase de aclaramiento "lenta"

C = Marcador total en la fase de aclaramiento "más lenta"

α = Constante de desintegración de la fase de aclaramiento "rápido"

β = Constante de desintegración de la fase de aclaramiento "lenta"

γ = Constante de desintegración de la fase de aclaramiento "más lenta"

t = Tiempo post administración

- 5 Las constantes de desintegración de las fases α , β , y γ pueden convertirse a vidas medias de sus respectivas fases como:

Vida media de la fase α = 0.69 (1/ α)

Vida media de la fase β = 0.69 (1/ β)

Vida media de la fase γ = 0.69 (1/ γ)

- 10 En el caso donde los datos se ajustan usando la ecuación biexponencial, los porcentajes del marcador total aclarado de la circulación *in vivo* a través de las fases α y β se calculan como:

% Fase α = [A/(A+B)] x 100

% Fase β = [B/(A+B)] x 100

- 15 En el caso donde los datos se ajustan usando la ecuación tri-exponencial, los porcentajes del marcador total aclarado de la circulación *in vivo* a través de las fases α y β se calculan como:

% Fase α = [A/(A+B+C)] x 100

- 20 % Fase β = [B/(A+B+C)] x 100

% Fase γ = [C/(A+B+C)] x 100

25 **Tabla 4: Aclaramiento plasmático en Ratones**

	T _{1/2} alfa(min.)	Aclaramiento (%)	T _{1/2} beta(min.)	Aclaramiento (%)
DX-890	1.3	79	59.2	21
DX-1000	1.5	87	26.9	13
	T _{1/2} alfa(h.)	Aclaramiento (%)	T _{1/2} beta(h.)	Aclaramiento (%)
5xPEG5-DX-890	1.1	33	20.2	67
4xPEG5-DX-1000	0.3	38	12.5	62

Tabla 5: Aclaramiento plasmático en Conejo

	T _{1/2} alfa(min.)	Aclaramiento (%)	T _{1/2} beta(h.)	Aclaramiento (%)	T _{1/2} gamma(h.)	Aclaramiento (%)
DX-890	1.7	83	3.4	17		
DX-1000	0.9	85	1	15		
5xPEG5-DX-890	2.8	28	4.5	34	97.6	38
4xPEG5-DX-1000	1.9	34	3	32	69.3	34

En el caso de tanto el ratón (Tabla 4) como conejo (Tabla 5), la PEGilación de cualquiera de DX-890 o de DX-1000 resulta en una disminución en la fracción de aclaramiento a través de la vía alfa. Al mismo tiempo aumenta la fracción de aclaramiento a través de vías de vida más larga (beta y gamma).

Las proteínas poli-PEGiladas mostraron además buena estabilidad *in vivo* por análisis de SEC.

Purificación:

Un método de purificación ilustrativo es como sigue:

1) Purificación de proteína poliPEGilada a partir de PEG exceso/sin reaccionar y cantidades trazas de especies PEGiladas tanto de alto peso molecular como bajo peso molecular pueden llevarse a cabo por cromatografía de intercambio iónico en un sistema de cromatografía AKTA básico 10/100 (Amersham).

2) Por ejemplo, una columna de tamaño y capacidad adecuada puede ser empacada con una resina de intercambio catiónico fuerte (es decir: Poros 50HS, Applied Biosystems, código de producto: 1-3359-11) en el caso de al menos DX-88 y DX-1000 PEGilado.

3) En resumen, un volumen de la mezcla de reacción de PEGilación se diluye de 5-15 veces o según sea necesario, con agua, seguido por ajuste del pH a pH ~3.0 con 1 M ácido acético (100-200 mM final) y conductividad <3 mS/cm.

4) La columna se equilibra primero con 100 mM ácido acético, pH 3.0. Velocidad de flujo lineal de 100 cm/hr.

5) Se carga y lava con lo mismo para ~5 volúmenes de columna. Velocidad de flujo lineal durante la carga es 50 cm/hr.

6) La proteína PEGilada se eluye de la columna en una serie de gradientes en etapa.

7) La primera etapa de elución es 100 mM ácido acético, con 20 mM NaCl, pH 3.2 para ayudar a eliminar los componentes de HMW (~20 CV a 100 cm/hr).

8) La segunda etapa de elución es 100 mM ácido acético con 50 mM NaCl, pH 3.8 (~10 CV a 100 cm/hr) eluye el producto principal (es decir: 4 x 5 kDa PEG/péptido para DX-88 y DX-1000).

9) La tercera y última etapa de elución es PBS, pH 7.2 (~5 CV 100 cm/hr) para ayudar a eliminar las trazas de especies PEGiladas de LMW.

10) Seguido por limpieza con 0.2 M NaOH (~5 CV con tiempo de contacto de 30 minutos).

11) Seguida por almacenamiento de la columna en 20% etanol (~ 10 CV).

12) Las fracciones se recogen a través del perfil y analizan por SDS-PAGE antes de mezclar.

13) La mezcla final de la proteína PEGilada purificada se UF/DF después en PBS, pH 7.2 usando medios convencionales disponibles. El material final se filtra por 0.22 um después, cuantifica por abs. 280 nm (como se describió anteriormente), se divide en alícuotas y congela de -20 °C a -80 °C hasta el uso.

Otro método ilustrativo de purificación, y uno que puede usarse para purificar DX-88 poli-PEGilado, es como sigue.

Los productos de la reacción se cargan en una columna de intercambio catiónico. Se encontró que Poros 50HS tiene una capacidad de unión razonable (~3 mg DX88-PEG5K/ml de resina) en esta pequeña escala que permite la separación de PEG libre y un eluato bastante concentrado que incluye las especies poli-PEGiladas. La conductividad puede mantenerse más abajo de 2 mS/cm. Por ejemplo, se puede usar una columna 9.5 cm AKTA Poros 50HS (1.1cm w. x 10 cm h.). La columna se lava y limpia para eliminar endotoxina y otros contaminantes. La columna puede equilibrarse y cargarse en acetato sódico 10 mM pH 3.5.

UF/DF y Análisis de la mezcla final DX-88-PEG5K

Las fracciones que contienen DX-88 poli-PEGilado se mezclaron para un volumen total de la muestra de ~6 ml. Se intercambió el tampón de la muestra en 1X DPBS pH 7.2 (no modificada) de Invitrogen (especificación de endotoxina < 0.25 EU/ml) y concentró mediante el uso de dos dispositivos de filtro centrífugos Amicon Ultra-15 con un peso molecular de corte o menos medida contra 1X DPBS. La muestra purificada DX-88-PEG5K se alícuotó en fracciones de 0.5 ml (2.5 mg cada una) en tubos estériles y congeló a -80 °C. La muestra diluida 1:10 se analizó por SDS-PAGE en una serie de dilución para estimar la pureza del producto principal de interés, 4-PEG5K-DX-88. La pureza de 4-PEG5K-DX-88 es aproximadamente 90%.

DX-890. Se preparó un DX-890 poli-PEGilado. La electroforesis en gel y análisis cromatográfico indicaron que una reacción con una relación de DX-890 a reactivo PEG 5K 1:50 o 1:63 produjo un producto de reacción que fue

predominantemente (>85%) un DX-890 modificado con cinco porciones de PEG unidas. DX-890 pegilado bajo una variedad de relaciones mantuvo su actividad específica respecto a un control (aproximadamente 10 U/mg). .

5 Se predice que DX-890 Polipegilado tiene cinco porciones de PEG (cada una con peso molecular aproximadamente de 5,266 daltons), más la masa de DX-890 (6,237 Daltons, teórico; 6,229 Daltons, observado). La masa total prevista es 34,682 Daltons. La masa de las especies observadas por MALDI-TOF fue aproximadamente de 34,219 Daltons, de acuerdo con la predicción teórica, según puede variar la masa de porciones de PEG individuales.

10 **DX-88.** Preparamos una DX-88 poli-PEGilada. La electroforesis en gel y análisis cromatográfico indicaron que una reacción con una relación de DX-890 a reactivo PEG 5K de 1:50 a pH 7.8 produjo un producto de reacción que fue predominantemente (>85%) un DX-88 modificado con cuatro porciones de PEG unidos.

15 Se predice que DX-88 Poli-pegilado tiene cuatro porciones de PEG (cada una que tiene aproximadamente 5,266 daltons de peso molecular), más la masa de DX-88 (7,054 Daltons). La masa total prevista es 28,126 Daltons. La masa de las especies observadas por MALDI-TOF fue aproximadamente de 29,680 Daltons, de acuerdo con la predicción teórica, según puede variar la masa de porciones de PEG individuales.

Otras modalidades están dentro de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende:

5 (i) un polipéptido que comprende un dominio de Kunitz que se une a e inhibe una proteasa, en donde el dominio de Kunitz se selecciona del grupo que consiste de:

10 (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de DX-890 que se expone en la sec. con núm. de ident.:23 o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero no más de cinco aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de DX-890 que se expone en la sec. con núm. de ident.:23;

15 (b) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de DX-88 que se expone en la sec. con núm. de ident.:24 o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero no más de cinco aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de DX-88 que se expone en la sec. con núm. de ident.:24; y

20 (c) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de DX-1000 que se expone en la sec. con núm. de ident.:25 o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero no más de cinco aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de DX-1000 que se expone en la sec. con núm. de ident.:25,

en donde el péptido no incluye una amina primaria en ninguna de las regiones bucles de unión del dominio de Kunitz, en donde dichas regiones bucles de unión corresponden a (i) las posiciones de aminoácidos 11 a 21, y (ii) las posiciones de aminoácidos 31 a 42 de la secuencia de aminoácidos del inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) que se expone en la sec. con núm. de ident.:2; y

25 (ii) una pluralidad de porciones de polietilenglicol, en donde el peso molecular promedio de cada porción de polietilenglicol es menor que 12 kDa, y cada uno de al menos cuatro aminas primarias del polipéptido está unida a una porción de polietilenglicol, en donde dichas aminas primarias consisten de una amina primaria N-terminal y/o aminas primarias de cadenas laterales de lisina.

30 2. El compuesto de la reivindicación 1,

(a) en donde el peso molecular promedio de cada porción de polietilenglicol es menor que 8 kDa;

(b) en donde cada porción de polietilenglicol tiene un peso molecular entre 3-8 kDa; o

35 (c) en donde el polipéptido tiene un peso molecular menor que 8 kDa, y el compuesto tiene un peso molecular mayor que 16 kDa.

3. El compuesto de la reivindicación 1,

40 (a) en donde el polipéptido no incluye una lisina en ninguna de las regiones bucles de unión del dominio de Kunitz;

45 (b) en donde el polipéptido incluye al menos dos lisinas en la región marco del dominio de Kunitz, en donde dicha región marco no incluye ninguna de las regiones bucles de unión que corresponde a (i) las posiciones de aminoácidos 11 a 21, y (ii) las posiciones de aminoácidos 31 a 42 de la secuencia de aminoácidos del inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) que se expone en la sec. con núm. de ident.:2;

50 (c) en donde el polipéptido comprende tres o cuatro lisinas en la región marco del dominio de Kunitz, en donde dicha región marco no incluye ninguna de las regiones bucles de unión que corresponde a (i) las posiciones de aminoácidos 11 a 21, y (ii) las posiciones de aminoácidos 31 a 42 de la secuencia de aminoácidos del inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) que se expone en la sec. con núm. de ident.:2; o

55 (d) en donde el polipéptido comprende una región marco que es idéntica a la región correspondiente de un dominio de Kunitz humano, en donde dicha región marco se define para no incluir ninguna de las regiones bucles de unión que corresponde a (i) las posiciones de aminoácidos 11 a 21, y (ii) las posiciones de aminoácidos 31 a 42 de la secuencia de aminoácidos del inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) que se expone en la sec. con núm. de ident.:2.

4. El compuesto de la reivindicación 1,

60 (a) en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de DX-890 que se expone en la sec. con núm. de ident.:23, o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero no más de cinco aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de DX-890 que se expone en la sec. con núm. de ident.:23, y la proteasa es elastasa;

(b) en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de DX-88 que se expone en la sec. con núm. de ident.:24, o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero no más de

cinco aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de DX-88 que se expone en la sec. con núm. de ident.:24, y la proteasa es calicreína; o

(c) en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de DX-1000 que se expone en la sec. con núm. de ident.:25, o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero no más de cinco aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de DX-1000 que se expone en la sec. con núm. de ident.:25, y la proteasa es plasmina.

5. Una preparación que comprende el compuesto de la reivindicación 1, en donde al menos 80% de los polipéptidos en la preparación

(i) se unen e inhiben la proteasa,

en donde los péptidos que se unen específicamente e inhiben la proteasa no incluye una amina primaria en ninguna de las regiones bucles de unión del dominio de Kunitz, en donde dichas regiones bucles de unión corresponden a (i) las posiciones de aminoácidos 11 a 21, y (ii) las posiciones de aminoácidos 31 a 42 de la secuencia de aminoácidos del inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) que se expone en la sec. con núm. de ident.:2, y

(ii) tienen una porción de polietilenglicol unida a cada una de al menos cuatro aminas primarias, en donde dichas aminas primarias consisten de una amina primaria N-terminal y/o amina primarias de cadenas laterales de lisina.

6. La preparación de la reivindicación 5, en donde el peso molecular promedio de cada una de las porciones de polietilenglicol unidas es menor que 10 kDa, particularmente menor que 8 kDa.

7. La preparación de la reivindicación 5, en donde al menos 95% de los polipéptidos del dominio de Kunitz en la preparación tienen una porción de polietilenglicol unida a cada una de las al menos cuatro amina primarias.

8. La preparación de la reivindicación 5,

(a) en donde los péptidos que se unen específicamente e inhiben la proteasa no incluyen una lisina en las regiones bucles de unión del dominio de Kunitz;

(b) en donde los péptidos que se unen específicamente e inhiben la proteasa incluyen al menos dos lisinas en la región marco del dominio de Kunitz, en donde dicha región marco no incluye ninguna de las regiones bucles de unión que corresponde a (i) las posiciones de aminoácidos 11 a 21, y (ii) las posiciones de aminoácidos 31 a 42 de la secuencia de aminoácidos del inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) que se expone en la sec. con núm. de ident.:2;

(c) en donde los péptidos que se unen específicamente e inhiben la proteasa incluyen tres lisinas en la región marco del dominio de Kunitz, en donde dicha región marco no incluye ninguna de las regiones bucles de unión que corresponde a (i) las posiciones de aminoácidos 11 a 21, y (ii) las posiciones de aminoácidos 31 a 42 de la secuencia de aminoácidos del inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) que se expone en la sec. con núm. de ident.:2;

(d) en donde los péptidos que se unen específicamente e inhiben el polipéptido proteasa incluyen cuatro lisinas en la región marco del dominio de Kunitz, en donde dicha región marco se define para no incluir ninguna de las regiones bucles de unión que corresponde a (i) las posiciones de aminoácidos 11 a 21, y (ii) las posiciones de aminoácidos 31 a 42 de la secuencia de aminoácidos del inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) que se expone en la sec. con núm. de ident.:2; o

(e) en donde los péptidos que se unen específicamente e inhiben la proteasa comprenden una región marco que es idéntica a la región correspondiente de un dominio de Kunitz humano, en donde dicha región marco se define para no incluir ninguna de las regiones bucles de unión que corresponde a (i) las posiciones de aminoácidos 11 a 21, y (ii) las posiciones de aminoácidos 31 a 42 de la secuencia de aminoácidos del inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) que se expone en la sec. con núm. de ident.:2.

9. La preparación de la reivindicación 5,

(a) en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de DX-890 que se expone en la sec. con núm. de ident.:23, o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero no más de cinco aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de DX-890 que se expone en la sec. con núm. de ident.:23, y la proteasa es elastasa;

(b) en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de DX-88 que se expone en la sec. con núm. de ident.:24, o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero no más de cinco aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de DX-88 que se expone en la sec. con núm. de ident.:24, y la proteasa es calicreína; o

(c) en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de DX-1000 que se expone en la sec. con núm. de ident.:25, o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero no más de

cinco aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de DX-1000 que se expone en la sec. con núm. de ident.:25, y la proteasa es plasmina.

- 5 10. La preparación de la reivindicación 5, en donde los polipéptidos del dominio de Kunitz comprenden la secuencia de aminoácidos de DX-890 y en donde al menos 80% de los polipéptidos que contienen DX-890 en la preparación tienen una porción de polietilenglicol unida a cada una de los cuatro residuos de lisina y al N-terminal del polipéptido.
- 10 11. La preparación de la reivindicación 5, en donde los polipéptidos comprenden la secuencia de aminoácidos de DX-88 y en donde al menos 80% de los polipéptidos del dominio de Kunitz que contienen DX-88 en la preparación tienen una porción de polietilenglicol unida a cada uno de los tres residuos de lisina y al N-terminal del polipéptido.
- 15 12. La preparación de la reivindicación 5, en donde los polipéptidos de dominio de Kunitz comprenden la secuencia de aminoácidos de DX-1000 y en donde al menos 80% de los polipéptidos del dominio de Kunitz que contienen DX-1000 en la preparación tienen una porción de polietilenglicol unida a cada uno de los tres residuos de lisina y al N-terminal del polipéptido.
- 20 13. Un método para proporcionar un dominio de Kunitz pegilado que se une e inhibe una proteasa, el método comprende:
- proporcionar un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de:
- 25 a) la secuencia de aminoácidos de DX-890 que se expone en la sec. con núm. de ident.:23 o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero no más de cinco aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de DX-890 que se expone en la sec. con núm. de ident.:23;
- (b) la secuencia de aminoácidos de DX-88 que se expone en la sec. con núm. de ident.:24 o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero no más de cinco aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de DX-88 que se expone en la sec. con núm. de ident.:24; y
- 30 (c) la secuencia de aminoácidos de DX-1000 que se expone en la sec. con núm. de ident.:25 o una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos uno, pero no más de cinco aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de DX-1000 que se expone en la sec. con núm. de ident.:25; y
- 35 - contactar el polipéptido con polietilenglicol activado, de peso molecular promedio menor que 12 kDa, bajo condiciones en las que cada una de al menos cuatro aminas primarias del polipéptido se une a una porción de polietilenglicol, en donde dichas aminas primarias consisten de una amina primaria N-terminal y/o aminas primarias de cadenas laterales de lisina.
- 40 14. El método de la reivindicación 13, en donde el dominio de Kunitz tiene al menos tres grupos de amina primaria en la región marco del dominio de Kunitz.
- 45 15. El método de la reivindicación 14,
- (a) en donde el marco comprende al menos tres lisinas, particularmente en donde la amina primaria de cada lisina del polipéptido se une a la porción de polietilenglicol;
- (b) en donde el rendimiento es mayor que 40%; o
- (c) en donde las condiciones para contactar son un pH mayor que 7.5.
- 50 16. El método de la reivindicación 14,
- (a) en donde las condiciones son tales que al menos 70% de las moléculas son pegiladas en cada una de las cuatro aminas primarias;
- (b) en donde las condiciones son tales que al menos 85% de las moléculas son pegiladas en cada una de las cuatro aminas primarias;
- 55 (c) en donde las condiciones son tales que al menos 70% de las moléculas pegiladas tienen el mismo número de porciones PEG unidas, las porciones se unen en las mismas posiciones; o
- (d) en donde las condiciones son tales que al menos 85% de las moléculas pegiladas tienen el mismo número de porciones PEG unidas, las porciones se unen en las mismas posiciones.
- 60 17. El método de la reivindicación 14, que además comprende formular el polipéptido pegilado como una composición farmacéutica.

18. El compuesto de la reivindicación 1 para usar en el tratamiento de un trastorno **caracterizado porque** actividad excesiva o indeseada de una proteasa, en donde el compuesto se administra a un sujeto que tiene el trastorno o se sospecha que tiene el trastorno, en donde el polipéptido del compuesto inhibe la proteasa.
- 5 19. El compuesto para usar de la reivindicación 18,
- 10 (a) en donde la proteasa es elastasa y el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de DX-890 o una secuencia que difiere en al menos uno, pero menos de seis alteraciones de aminoácidos de DX-890, particularmente en donde el trastorno es fibrosis quística, COPD, o un trastorno inflamatorio;
- (b) en donde la proteasa es calicreína y el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de DX-88 o una secuencia que difiere en al menos uno, pero menos de seis alteraciones de aminoácidos de DX-88, particularmente en donde el trastorno es hemofilia, sangrado post-operatorio, sangrado peri-operatorio, o angioedema hereditario; o
- 15 (c) en donde la proteasa es plasmina y el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de DX-1000 o una secuencia que difiere en al menos uno, pero menos de seis alteraciones de aminoácidos de DX-1000, particularmente en donde el trastorno es fibrinólisis o fibrinogenólisis, sangrado excesivo asociado con trombolíticos, sangrado post-operatorio, sangrado peri-operatorio, y androgénesis inapropiada

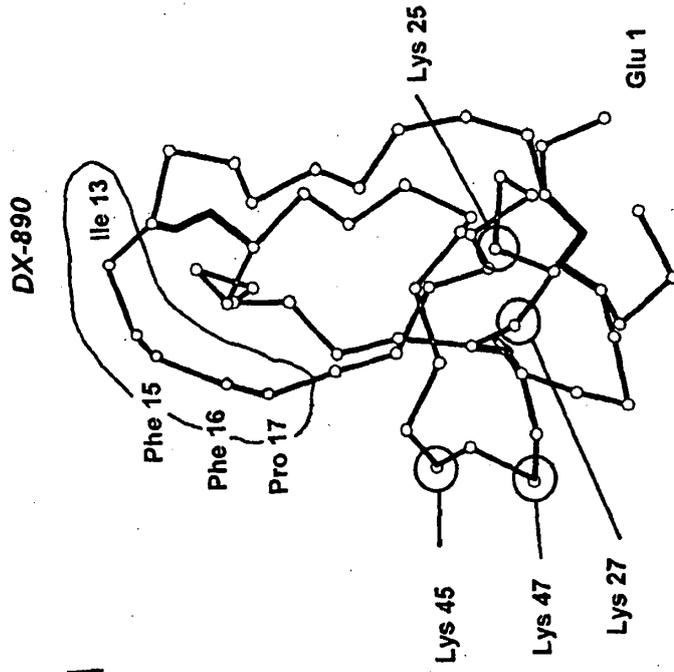
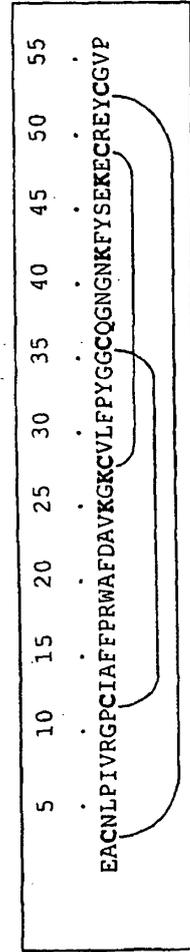


FIG. 1



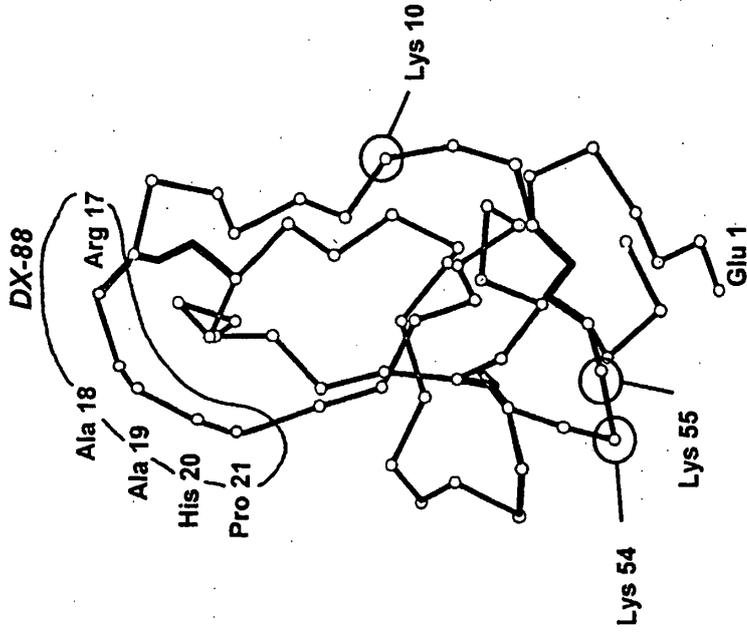
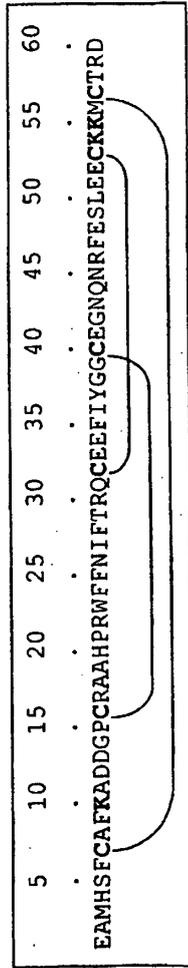


FIG. 2



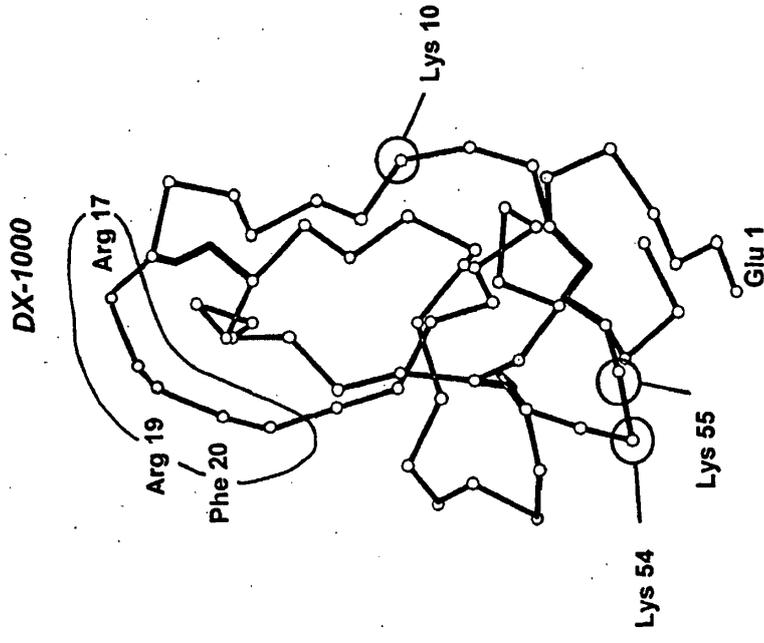
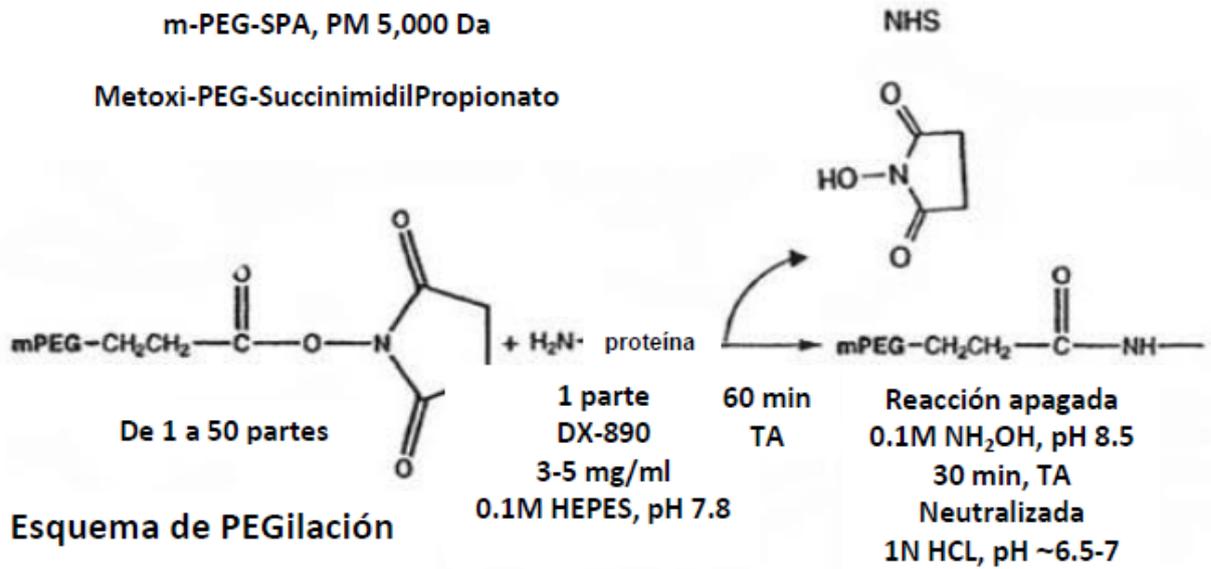


FIG. 3

5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	
E	A	M	S	F	C	A	F	K	A	E	T	G
.	
P	C	R	A	R	F	D	R	W	F	N	I	
F	T	R	Q	C	E	E	F	I	Y	G	G	
.	
C	E	E	C	K	K	M	C	T	R	D		



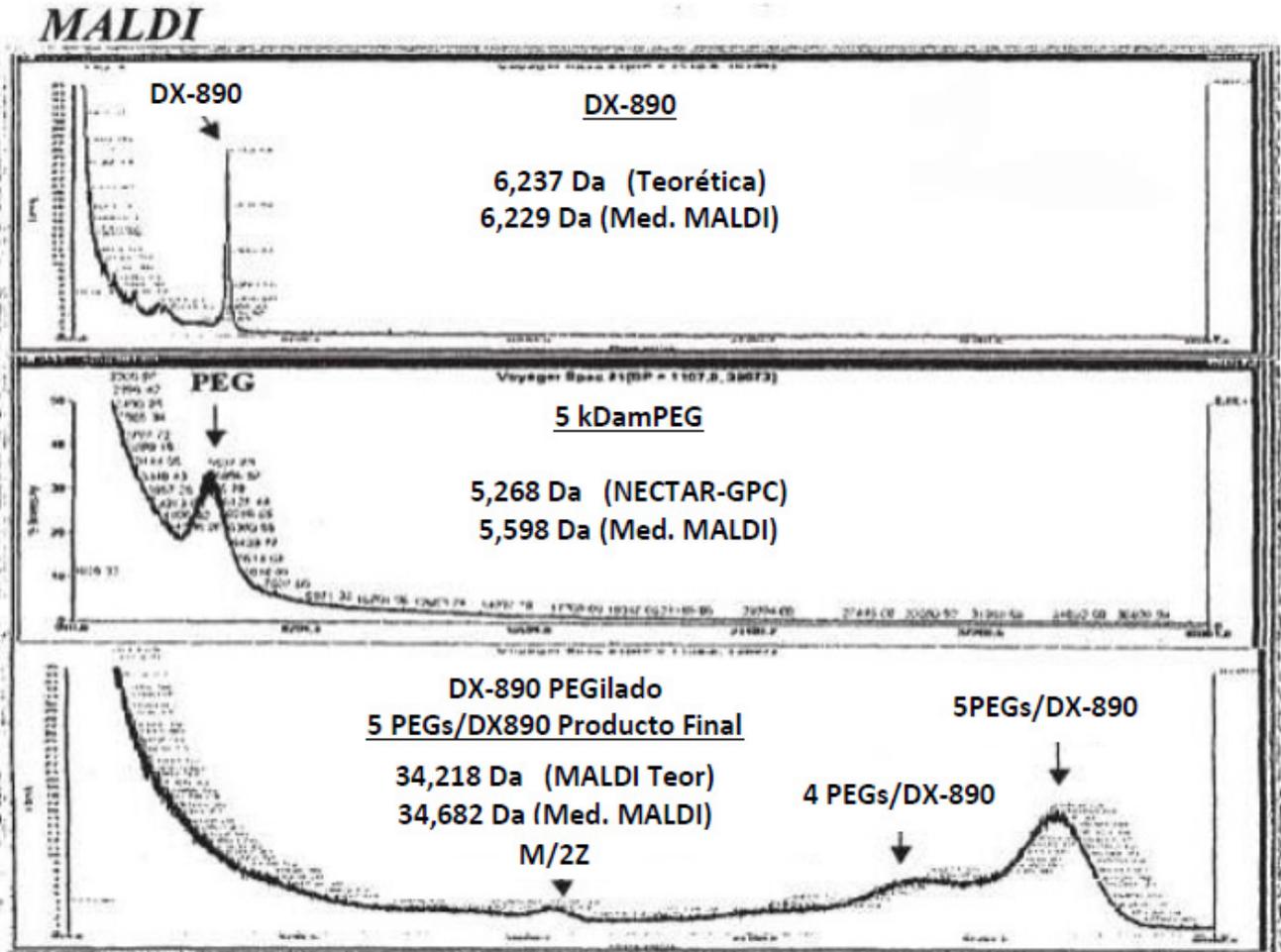
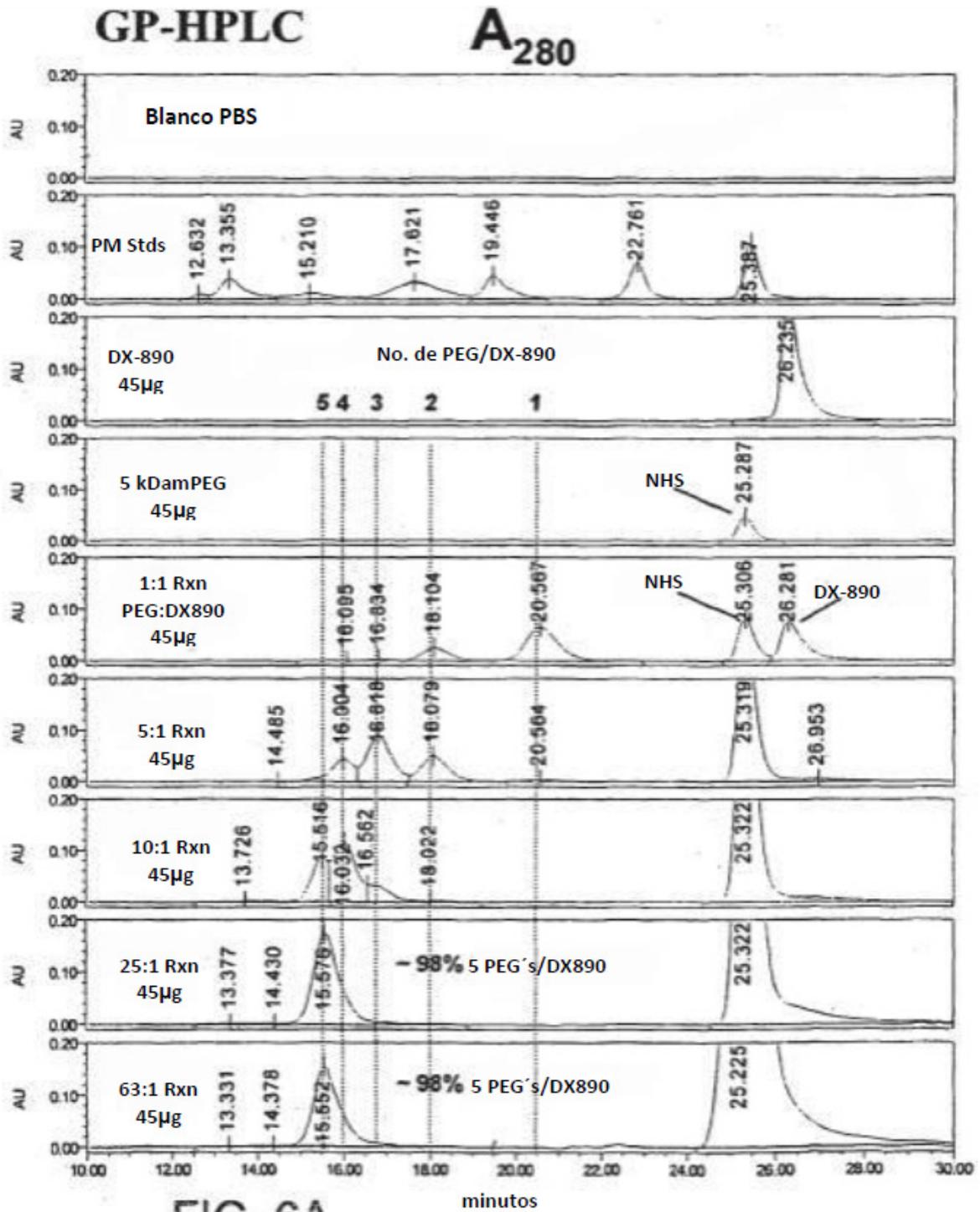


FIG. 5



GP-HPLC

Índice Refractivo

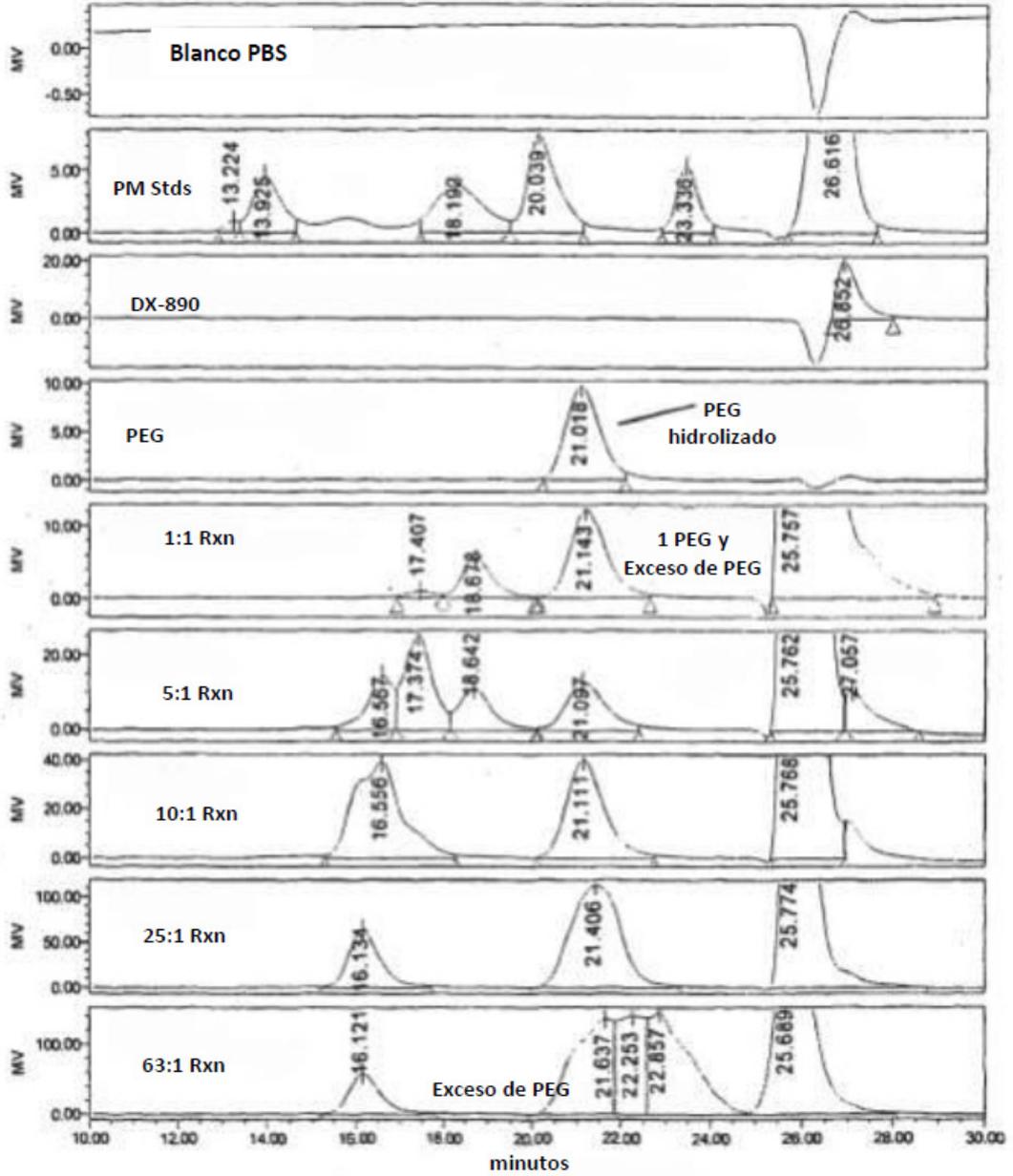


FIG. 6B

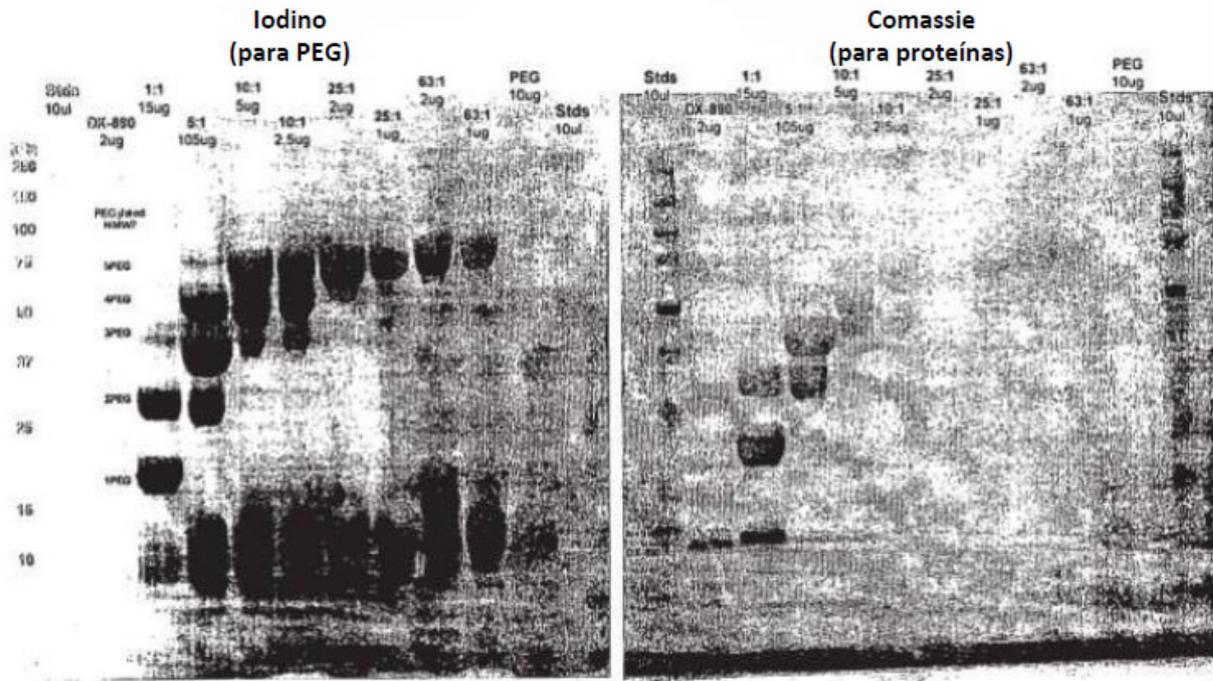


FIG. 7

FIG. 8a

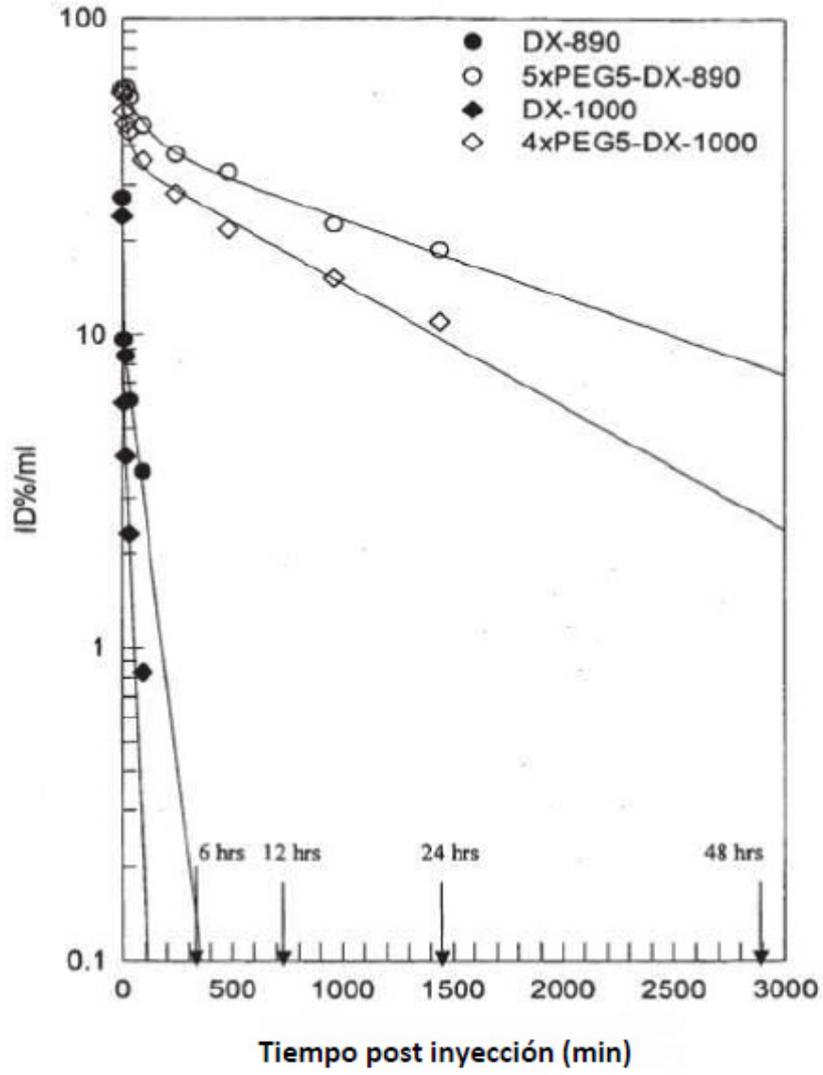


FIG. 8b

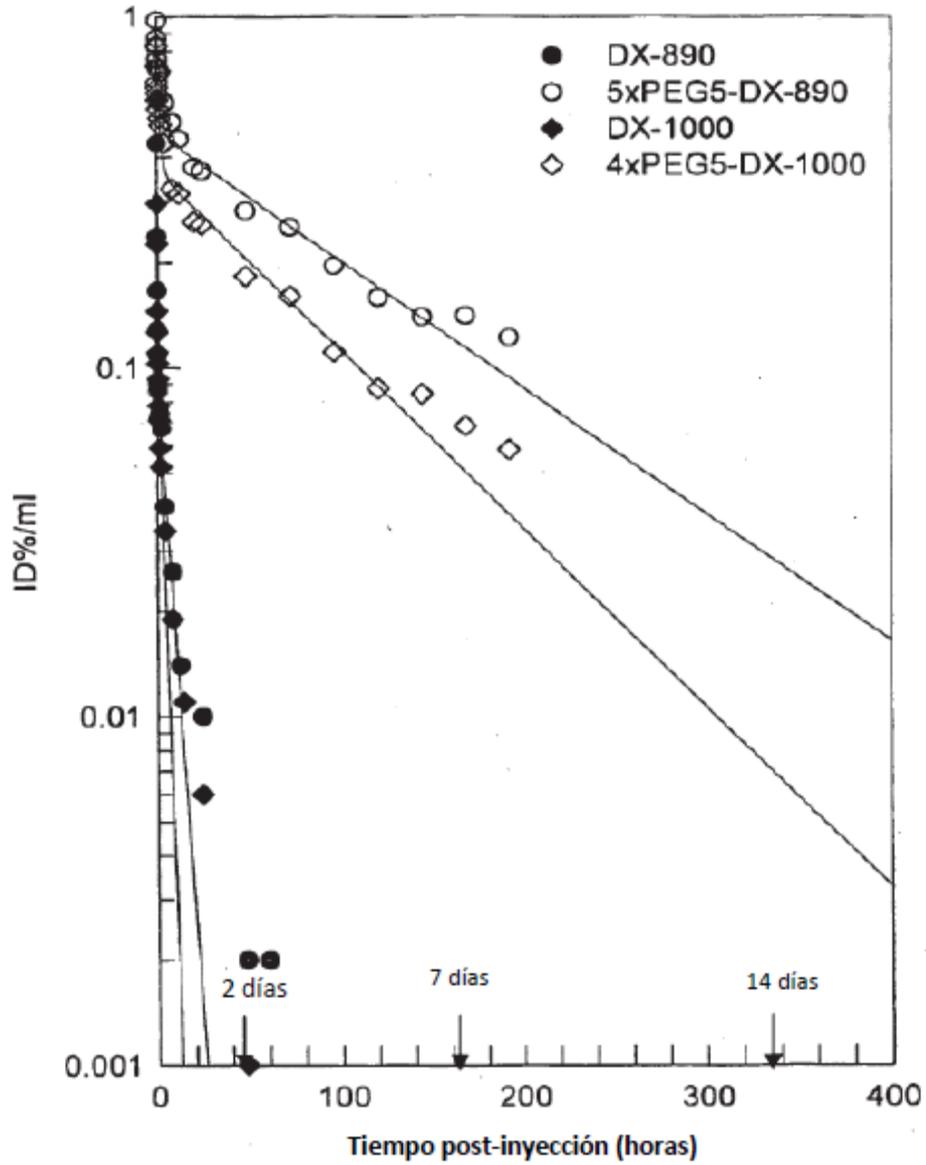
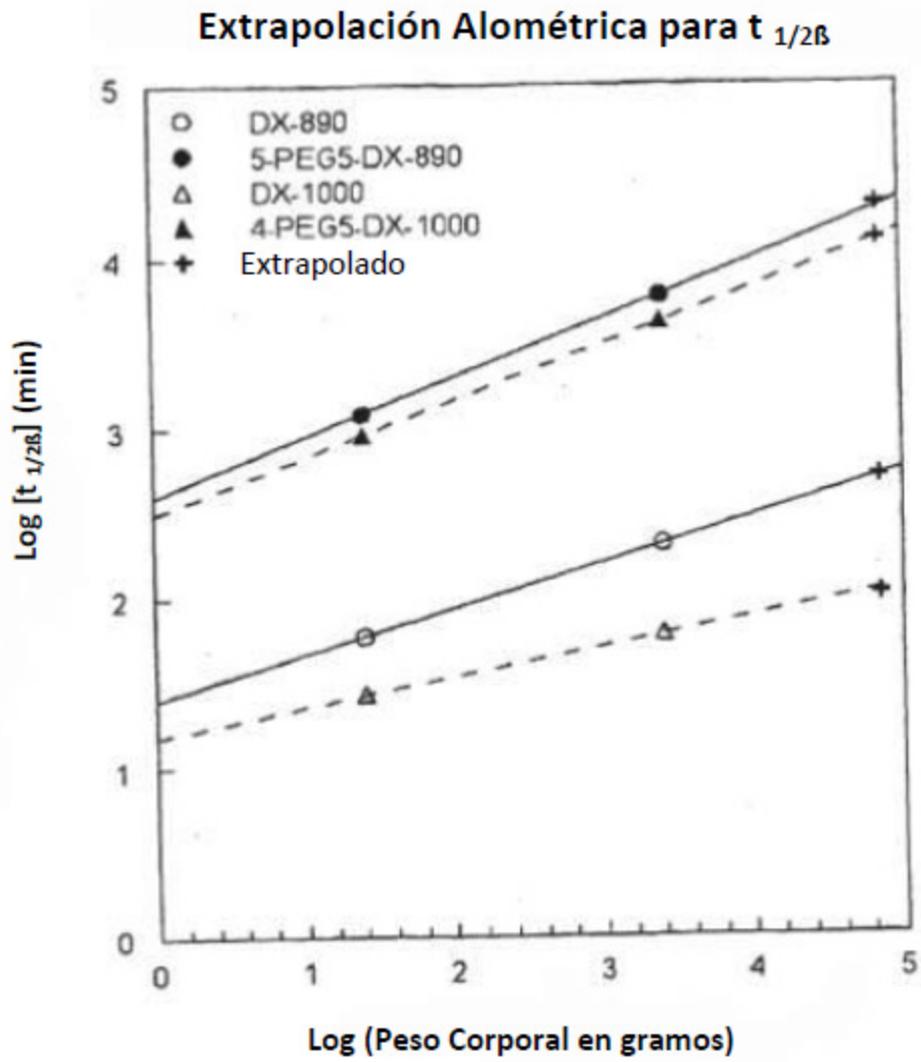


FIG. 8c



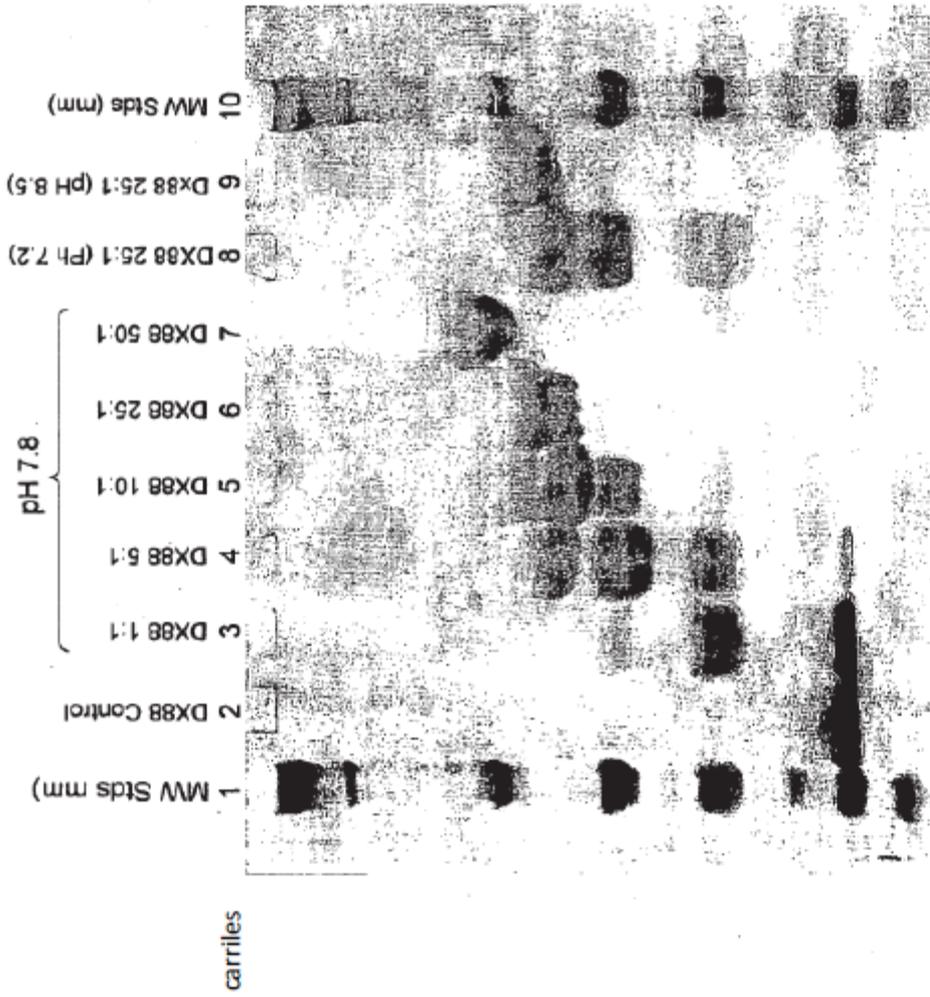


FIG. 9