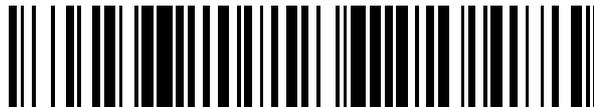


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 514 615**

51 Int. Cl.:

C07K 14/81 (2006.01)

A61K 38/57 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.1995 E 10164197 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014 EP 2233498**

54 Título: **Proteínas de dominio Kunitz inhibidores de calicreína y ácidos nucleicos que codifican las mismas**

30 Prioridad:

11.01.1994 US 179964

10.03.1994 US 208264

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

28.10.2014

73 Titular/es:

DYAX CORPORATION (100.0%)

55 Network Drive

Burlington, MA 01803, US

72 Inventor/es:

MARKLAND, WILLIAM y

LADNER, ROBERT CHARLES

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 514 615 T3

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

Descripción

Proteínas de dominio Kunitz inhibidores de calicreína y ácidos nucleicos que codifican las mismas

- 5 Antecedentes de la invención
- Campo de la invención
- 10 Esta invención se relaciona con nuevas clases de proteínas y análogos de proteínas que se unen a e inhiben la calicreína plasmática humana.
- Descripción de la Técnica Anterior
- 15 Las calicreínas son serina proteasas que se encuentran tanto en tejidos como en plasma. La calicreína de plasma está implicada en la coagulación activada por contacto (vía intrínseca), la fibrinólisis, la hipotensión y la inflamación. (Ver BHO092) Estos efectos de la calicreína están mediados a través de las actividades de tres sustratos fisiológicos distintos: I) Factor XII (coagulación), ii) Pro-uroquinasa/plasminógeno (fibrinólisis), y iii) Quininógenos (hipotensión e inflamación).
- 20 La escisión de la calicreína a los quinínógenos resulta en la producción de cininas, pequeños péptidos bioactivos altamente potentes. Las cininas actúan a través de receptores de la superficie celular presentes en una variedad de tipos de células. Proteínas G heterotriméricas intracelulares enlazan los receptores de cininas a las vías de segundo mensajero, incluyendo óxido nítrico, la adenilato ciclasa, fosfolipasa A₂, y fosfolipasa C. Entre las actividades fisiológicas importantes de cininas están: (i) aumento de permeabilidad vascular; (ii) vasodilatación; (iii) broncoespasmo; y (iv) dolor de inducción. Así, las cininas median el shock vascular que amenaza la vida y el edema asociado con bacteriemia (sepsis) o trauma, el edema y la hiperreactividad de las vías respiratorias del asma, y tanto el dolor inflamatorio como neurogénico asociado con lesión de los tejidos. Las consecuencias de la actividad inadecuada de la calicreína plasmática y la producción cinina resultante se ilustran dramáticamente en pacientes con angioedema hereditario (HA). La HA es debida a una deficiencia genética del inhibidor de C1, el principal inhibidor endógeno de la calicreína plasmática. Los síntomas de la HA incluyen edema de la piel, tejidos subcutáneos y el tracto gastrointestinal y dolor abdominal y vómitos. Casi un tercio de los pacientes con HA mueren por asfixia debido a edema de la laringe y el tracto respiratorio superior. La calicreína se secreta como un zimógeno (precalicreína) que circula como una molécula inactiva hasta que es activado por un evento proteolítico que libera el +NH₃-IVGGTNSS ... secuencia de la calicreína (sec. con núm. de ident. 1). La Precalicreína Humana de Plasma se encuentra en Genebank entrada P03952.
- 25 La calicreína madura de plasma contiene 619 aminoácidos. La hidrólisis del enlace peptídico Arg₃₇₁-Ile₃₇₂ produce una proteinasa de dos cadenas unidas por un enlace disulfuro. La cadena ligera amino-terminal (residuos 248) lleva el sitio catalítico.
- 30 El principal inhibidor de la calicreína plasmática (pKA) *in vivo* es el inhibidor de C1; ver SCHM87, pp.27-28. La C1 es una serpina y forma un complejo esencialmente irreversible con pKA. Aunque el inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) fue el primer inhibidor fuerte de pKA con K_i = 320 pM (AUER88), BERN93 indica que su K_i para pKA es 30 nM (*por ejemplo*, 30,000 pM). El mutante G36S tenía una K_i de más de 500 nM. Así, existe una necesidad de un inhibidor de la calicreína seguro. Los atributos esenciales de un agente de este tipo son:
451. I. La neutralización de la enzima(s) calicreína pertinente;
II. Unión de alta afinidad a calicreínas para minimizar la dosis diana;
III. Alta especificidad para la calicreína, para reducir los efectos secundarios; y
IV. Alto grado de similitud con una proteína humana para minimizar la inmunogenicidad potencial y la toxicidad de órganos/tejidos.
502. Las calicreínas candidatas diana para ser inhibidas son serina proteasas homólogas a quimotripsina.

Sangrado Excesivo

- 55 El sangrado excesivo puede ser resultado a partir de una actividad deficiente de la coagulación, la actividad fibrinolítica elevada, o una combinación de los dos. En la mayoría de las diátesis hay que controlar la actividad de la plasmina. Sin embargo, la calicreína plasmática (pKA) es un activador de plasminógeno y un inhibidor potente, un inhibidor selectivo de pKA puede evitar la activación del plasminógeno. El efecto clínico beneficioso de BPTI en la reducción de la pérdida de

sangre se cree que es resultado a partir de su inhibición de la plasmina ($K_D \sim 0.3$ nM) o de la calicreína plasmática ($K_D \sim 100$ nM) o ambas enzimas. Se ha encontrado, sin embargo, que BPTI es suficientemente antigénico que segundos usos requieren pruebas de la piel. Además, las dosis de BPTI requeridas para controlar el sangrado son bastante altas y el mecanismo de acción no está claro. Algunos dicen que el BPTI actúa en plasmina, mientras que otros dicen que actúa mediante la inhibición de la calicreína plasmática. FRAE89 reporta que las dosis de aproximadamente 840 mg de BPTI a 80 pacientes de cirugía a corazón abierto reducen la pérdida de sangre casi a la mitad y la cantidad media transfundida se redujo en 74%. Miles Inc. ha introducido recientemente Trasylol en EE.UU. para la reducción de la hemorragia en la cirugía (Véase el folleto del producto Miles de Trasylol, LOHM93 sugiere que los inhibidores de plasmina pueden ser útiles en el control de la hemorragia en la cirugía del ojo. SHER89 reporta que el BPTI puede ser útil para limitar la hemorragia en la cirugía de colon.

Un inhibidor de la calicreína que es mucho más potente que el BPTI y que es casi idéntica a una proteína de dominio humano ofrece un potencial terapéutico similar, permite que la dosis se reduzca, y supone un menor potencial de antigenicidad.

Con las técnicas de ADN recombinante, se puede obtener una nueva proteína mediante la expresión de un gen mutado de una proteína parental. Varias estrategias se conocen para recoger mutaciones para prueba. Una "cirugía de proteína", implica la introducción de una o más mutaciones predeterminadas en el gen de elección. Un único polipéptido de secuencia completamente predeterminada se expresa, y se evalúan sus características de unión.

En el otro extremo está la mutagénesis aleatoria mediante mutágenos relativamente inespecíficos, como la radiación y diversos agentes químicos, ver Lehtovaara, E.P. Appln. 285,123, o por la expresión de ADN altamente degenerados. También es posible seguir una estrategia intermedia en la que algunos residuos se mantienen constantes, otros se mutan al azar, y otros aún se mutan de una manera predeterminada. Esto se denomina "**variegación**". Ver Ladner, y otros. USP 5,220,409.

DENN94a y DENN94b reportan selecciones de dominios Kunitz basados en APP-I para la unión al complejo del Factor Tisular con el Factor VII. No usaron LACI-K1 como parental y no usaron pKA como una diana. La mayor afinidad de unión que obtuvieron tenía K_D para su diana de aproximadamente 2 nM. Nuestros seleccionados de la primera ronda para la unión a pKA tienen afinidad de aproximadamente 0.3 nM, y nuestros seleccionados de la segunda ronda están cerca de 0.1 nM (= 100 pM) o mejor.

Las proteínas extraídas a partir de una especie en particular se supone que son menos propensas a causar una respuesta inmune cuando se inyectan en los individuos de esa especie. Los anticuerpos murinos son altamente antigénicos en seres humanos. Los anticuerpos "quiméricos" que tienen dominios constantes murinos y dominios variables murinos decididamente son menos antigénicos. Los denominados anticuerpos "humanizados" tienen dominios constantes humanos y dominios variables en las que las CDRs se toman de los anticuerpos murinos, mientras que el marco de los dominios variables son de origen humano. Los anticuerpos "humanizados" son mucho menos antigénicos que los anticuerpos "quiméricos". En un anticuerpo "humanizado", cincuenta a sesenta residuos de la proteína son de origen no humano. Las proteínas de esta invención comprenden, en la mayoría de los casos, sólo aproximadamente sesenta aminoácidos y por lo general hay diez o menos diferencias entre la proteína manipulada y la proteína parental. Aunque los seres humanos desarrollan anticuerpos incluso a proteínas humanas, tales como la insulina humana, tales anticuerpos tienden a unirse débilmente y frecuentemente no impiden que la proteína inyectada muestre su función biológica deseada. El uso de una proteína de la especie a tratar no garantiza que no habrá respuesta inmune. Sin embargo, escogiendo una proteína muy parecida en secuencia a una proteína humana reduce en gran medida el riesgo de una fuerte respuesta inmune en los seres humanos.

Los dominios Kunitz son altamente estables y pueden ser producidos eficientemente en levadura u otros organismos huésped. Se han reportado al menos diez dominios Kunitz humanos. Aunque el BPTI se pensó en algún momento que era un potente inhibidor pKA, en realidad, no hay dominios Kunitz humanos que inhiban la pKA muy bien. Así, es un objetivo de esta invención proporcionar secuencias de dominios Kunitz que son potentes inhibidores de la pKA y parecidos en secuencia a los dominios Kunitz humanos.

El uso de mutagénesis de sitio específica, ya sea aleatoria o no aleatoria, para obtener proteínas de unión mutantes de actividad mejorada, se conoce en la materia, pero no garantiza que las proteínas mutantes tengan la especificidad de la diana o afinidad deseadas. Dada la mala actividad anti-calicreína de BPTI, la mutación de BPTI u otras proteínas de dominio de Kunitz no se habría considerado, antes de esta invención, un método preferido de obtención de un aglutinante más fuerte, solo inhibidor, de la calicreína.

RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona con nuevos dominios Kunitz homólogos a BPTI, especialmente homólogos a LACI, que inhiben una o más calicreínas de plasma (y/o tejido), y el uso terapéutico de estas nuevas proteínas. En particular, esta invención se relaciona con dominios Kunitz derivados de dominios Kunitz de origen humano y especialmente al primer dominio Kunitz de LACI; dominios Kunitz de origen humano es probable que no sean inmunogénicos en seres humanos. Las proteínas de esta invención inhiben la calicreína plasmática (y/o la calicreína tisular) con una K_D de no más de 20 nM, preferiblemente, no más de 5 nM, más preferiblemente, no más de aproximadamente 300 pM, y más preferiblemente, no más de aproximadamente 100 pM.

En un primer aspecto la presente invención proporciona

Un polipéptido que inhibe la calicreína que comprende una estructura de dominio Kunitz que comprende la secuencia de aminoácidos:

**Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Cys-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Gly-Xaa13-
Cys-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Xaa22-Xaa23-Xaa24-Xaa25-
Xaa26-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Cys-Xaa31-Xaa32-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Gly-Cys-
Xaa39-Xaa40-Xaa41-Xaa42-Xaa43-Xaa44-Xaa45-Xaa46-Xaa47-Xaa48-Xaa49-Xaa50-
Cys-Xaa52-Xaa53-Xaa54-Cys-Xaa56-Xaa57-Xaa58,**

en donde:

Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 o Xaa58 pueden estar ausentes;
Xaa10 se selecciona a partir de Asp, Glu, Ala, Gly, Ser, y Thr;
Xaa11 se selecciona a partir de Asp, Gly, Ser, Val, Glu, Leu, Met, Asn, Ile, Ala y Thr;
Xaa13 se selecciona a partir de Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys y Gln;
Xaa15 se selecciona a partir de Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn y Gln;
Xaa16 se selecciona a partir de Ala, Gly, Ser, Asp, y Asn;
Xaa17 se selecciona a partir de Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln y Thr;
Xaa18 se selecciona a partir de His, Leu, Gln, y Ala;
Xaa19 se selecciona a partir de Pro, Gln, Leu, Asn, y Ile;
Xaa20 se selecciona a partir de Arg, Leu, Ala, Ser, Lys, Gln, y Val;
Xaa21 se selecciona a partir de Trp, Phe, Tyr, His y Ile;
Xaa22 se selecciona a partir de Tyr y Phe;
Xaa23 se selecciona a partir de Tyr y Phe;
Xaa31 se selecciona a partir de Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile y Thr;
Xaa32 se selecciona a partir de Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly y Val;
Xaa33 se selecciona a partir de Phe y Tyr;
Xaa34 se selecciona a partir de Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly y Leu;
Xaa35 se selecciona a partir de Tyr, Trp y Phe;
Xaa36 se selecciona a partir de Gly, Ser y Ala;
Xaa39 se selecciona a partir de Gly, Glu, Ala, Ser y Asp;
Xaa40 se selecciona a partir de Gly y Ala;
Xaa43 se selecciona a partir de Asn y Gly; y
Xaa45 se selecciona a partir de Phe y Tyr;

para su uso en el tratamiento o prevención del edema de la piel, tejido subcutáneo, la laringe, el tracto respiratorio superior o el tracto gastrointestinal en un paciente, en donde dicho edema se asocia con excesiva actividad de calicreína

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de la inhibición de la calicreína que comprende una estructura de dominio Kunitz que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone anteriormente para el primer aspecto, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el edema de la piel, tejido subcutáneo,

la laringe, el tracto respiratorio superior o el tracto gastrointestinal en un paciente, en donde dicho edema se asocia con actividad excesiva de la calicreína

Otros aspectos y modalidades de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

5 Un inhibidor de alta afinidad específica, de la calicreína plasmática (y, cuando sea necesario, la calicreína tisular) demostrará la utilidad terapéutica significativa en todas las condiciones patológicas mediadas por la calicreína, y especialmente aquellas asociados con cininas. El enfoque terapéutico de la inhibición de la producción catalítica de cininas se considera que antagoniza preferentemente con los receptores de cininas, ya que en ausencia de la inhibición de la calicreína, antagonistas de los receptores deben competir con la generación continua de cinina. Significativamente, la deficiencia genética de la calicreína plasmática es benigna y así, la inhibición de la calicreína plasmática es probable que sea segura. Hemos descubierto recientemente un inhibidor de pKA principal, designado KKII/3#6. Este inhibidor es una variante de una proteína de plasma humano de dominio Kunitz de origen natural y demuestra significativamente mayor potencia de unión a calicreína que Trasylol. KKII/3#6 tiene un K_i para calicreína que es más de 100 veces mayor que la de ambos LACI y BPTI de tipo salvaje, y cerca de 300 pM. Por el contrario, su K_i para plasmina es de 10 M. Proteínas KK2/#11 y KK2/#13 son inhibidores de pKA especialmente preferidos y tienen $K_i < 300$ pM y probablemente menor de 100 pM. Un inhibidor reversible se cree que es de mayor utilidad que un inhibidor irreversible tales como el inhibidor de CI.

20 La transferencia de las subsecuencias que confieren la unión a pKA en otros dominios Kunitz, particularmente dominios Kunitz humanos se dan a conocer.

Los inhibidores de pKA preferidos de la presente invención cumplen uno o más de los siguientes objetivos esenciales:

- 25 1) el inhibidor inhibe la calicreína plasmática con un K_i no más de 20 nM, preferiblemente 5 nM o menos, más preferentemente 300 pM o menos, y lo más preferentemente 100 pM o menos,
 2) el inhibidor comprende un dominio Kunitz que cumple los requisitos que se muestran en la Tabla 14 con los residuos numerados por referencia a BPTI,
 3) el inhibidor tiene en las posiciones 12-21 y 32-39 del dominio de Kunitz uno de los tipos de aminoácidos enumerados para esa posición en la Tabla 15, y
 30 4) el inhibidor es sustancialmente homólogo a una secuencia de referencia de origen esencialmente humano seleccionado a partir del grupo KKII/3#6, KK2/#11, KK2/#13, KK2/#1, KK2/#2, KK2/#3, KK2/#4, KK2/#6, KK2/#7, KK2/#8, KK2/#9, KK2/#10, KK2/#12, KK2con1, LACI-K2 Humano, LACI-K3 Humano, KuDom α 3 Colágeno Humano, DOMINIO 1 TFPI-2 Humano, DOMINIO 2 TFPI-2 Humano, DOMINIO 3 TFPI-2 Humano, ITI-K1 HUMANO, ITI-K2 Humano, PROTEASA NEXINA-II HUMANA, APP-I Humano, DKI-1.2.1, DKI-1.3.1, DKI-2.1, DKI-3.1.1, DKI-3.2.1, DKI-3.3.1, DKI-4.1.1, DKI-4.2.1, DKI-4.2.2, DKI-5.1, y DKI-6.1

Nomenclatura

40 En la presente invención, las afinidades se indican como K_D ($K_D(A,B)=[A][B]/[A-B]$). Una K_D numéricamente más pequeña refleja mayor afinidad. Para los fines de esta invención, una "proteína inhibidora de calicreína" es una que se une e inhibe la calicreína especificada con una K_i de aproximadamente 20 nM o menos. "Inhibición" se refiere al bloqueo de la actividad catalítica de la calicreína y así es medible en ensayos *in vitro* usando sustratos cromogénicos o fluorogénicos o en ensayos que implican macromoléculas.

45 Los residuos de aminoácidos se tratan de tres maneras: nombre completo del aminoácido, código de tres letras estándar, y el código de una sola letra estándar. El texto usa nombres completos y código de tres letras donde se requiera claridad.

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

Para los fines de esta invención, secuencias "**sustancialmente homólogas**" son al menos 51%, más preferiblemente al menos 80%, idénticas, sobre cualquier región determinada. Para esta invención, "sustancialmente homólogo" incluye identidad exacta. Las secuencias todavía serían "sustancialmente homólogas" si dentro de una región de al menos 20 aminoácidos fueran suficientemente similares (51% o más), pero fuera de la región de comparación difirieran totalmente. Una inserción de un aminoácido en una secuencia con respecto a los otros cuenta como una divergencia. Con la máxima preferencia, no más de seis residuos, excepto en los extremos, son diferentes. Preferentemente, la divergencia en la secuencia, particularmente en las regiones determinadas, está en forma de "modificaciones conservadoras".

"Modificaciones conservadoras" se definen como

- a) sustituciones conservadoras de aminoácidos tal como se definen en la Tabla 9; y
- (b) inserciones o deleciones de aminoácidos en las terminales individuales o múltiples, en los límites de dominio,

en bucles o en otros segmentos de movilidad relativamente alta.

Preferentemente, excepto en los extremos, no más de aproximadamente seis aminoácidos se insertan o eliminan en cualquier lugar, y las modificaciones son regiones de fuera conocidas por contener sitios de unión importantes.

Dominios de Kunitz

En la presente invención, "**dominio Kunitz**" y "**KuDom**" se usan indistintamente para referirse un homólogo de BPTI (no del inhibidor de tripsina de soja Kunitz). Un KuDom es un dominio de una proteína que tiene al menos 51 aminoácidos (y hasta aproximadamente 61 aminoácidos) que contiene al menos dos, y preferentemente tres, disulfuros. En la presente invención, los residuos de **todos los dominios Kunitz se numeran como referencia a BPTI** (es decir, residuos 1-58, secuencia de aminoácidos en la Tabla 2). Así, el primer residuo de cisteína es el residuo 5 y la última cisteína es 55. Una secuencia de aminoácido se considerará, a los fines de esta invención, un dominio Kunitz si puede ser alineado, con tres o menos divergencias, a la secuencia mostrada en la Tabla 14. Una inserción o deleción de un residuo se contabilizarán como una divergencia. En la Tabla 14, "x" coincide con cualquier aminoácido y "X" coincide con los tipos enumerados para esa posición. Los puentes disulfuro enlazan al menos dos de 5 a 55, 14 a 38, y 30 a 51. El número de disulfuros puede reducirse a una, pero ninguna de las cisteínas estándar quedará desapareada. Así, si se cambia una cisteína, después se añade una cisteína de compensación en un lugar adecuado o la cisteína coincidente además se sustituye por una no-cisteína (siendo este último preferido generalmente). Por ejemplo, *Drosophila funebris* el inhibidor de proteasa de la glándula accesorio del macho no tiene cisteína en la posición 5, pero tiene una cisteína en la posición -1 (justo antes de la posición 1); presumiblemente ésta forma un disulfuro a CYS₅₅. Si Cys₁₄ and Cys₃₈ se sustituyen, el requisito de Gly₁₂, (Gly o Ser)₃₇, y Gly₃₆ se pierde De cero a muchos residuos, incluyendo dominios adicionales (incluyendo otros KuDoms), se pueden conectar a cualquiera de los extremos de un dominio Kunitz.

Descripción detallada de las modalidades preferidas

Los inhibidores de proteasa, tales como los dominios Kunitz, funcionan uniéndose al sitio activo de la proteasa para que un enlace peptídico (el "enlace escindible") sea: 1) no escindido 2) escindido muy lentamente, o 3) escindido o ningún efecto debido a la estructura del inhibidor evita la liberación o la separación de los segmentos escindidos. En los dominios de Kunitz, los enlaces disulfuro actúan para mantener la proteína unida incluso si se rompen los enlaces peptídicos expuestos. A partir del residuo en el lado amino del enlace escindible, y alejándose de la unión, los residuos se denominan, convencionalmente P1, P2, P3, etc. Los residuos que siguen el enlace escindible se denominan P1', P2', P3', etc. (SCHE67, SCHE68). Es generalmente aceptado que cada serina proteasa tiene sitios (que comprenden varios residuos) S1, S2, etc. que reciben los grupos secundarios y los átomos de la cadena principal de los residuos P1, P2, etc. del sustrato o inhibidor y sitios S1', S2', etc. que reciben los grupos secundarios y los átomos de la cadena principal de P1', P2', etc. del sustrato o inhibidor. Son las interacciones entre los sitios S y los grupos laterales P y átomos de la cadena principal las que dan la especificidad de la proteasa con respecto a los sustratos y la especificidad con respecto a los inhibidores de proteasas. Debido a que el fragmento que tiene el nuevo extremo amino terminal sale de la primera proteasa, mucho trabajado de diseño de inhibidores de moléculas pequeñas de la proteasa se ha concentrado en compuestos que se unen los sitios S 1, S2, S3, etc.

LASK80 revisa inhibidores proteicos de proteasa. Algunos inhibidores tienen varios sitios reactivos en una cadena de polipéptidos, y estos dominios suelen tener diferentes secuencias, especificidades, e incluso topologías. Se sabe que la sustitución de aminoácidos en la región P₅ a P₅ influye en la especificidad de un inhibidor. Anteriormente, la atención se ha

centrado en el residuo P1 y aquellos muy cerca de ella ya que estos pueden cambiar la especificidad de una clase de enzima a otra. LASK80 sugiere que entre KuDoms, los inhibidores con P1=Lys o Arg inhiben la tripsina, aquellos con P1=Tyr, Phe, Trp, Leu y Met inhiben la quimotripsina, y aquellos con P1=Ala o Ser son propensos a inhibir la elastasa. Entre los inhibidores Kazal, LASK80 continúa, inhibidores con P1=Leu o Met son fuertes inhibidores de la elastasa, y en la familia de elastasa Bowman-Kirk se inhibe con P1=Ala, pero no con P1=Leu. Tales cambios limitados no proporcionan inhibidores de afinidad verdaderamente alta (es decir, mejor que 1 a 10 nM).

KuDoms se han definido anteriormente. La estructura 3D (a alta resolución) de BPTI (del dominio de Kunitz arquetípico) es conocida. Una de las estructuras de rayos-X está depositada en el Banco de Datos de Proteínas Brookhaven como "6PTI"]. La estructura 3D de algunos homólogos BPTI (EIGE90, HYNE90) es conocida. Al menos setenta secuencias KuDom son conocidas. Homólogos humanos conocidos incluyen tres KuDoms de LACI (WUNT88, GIRA89, NOVO89), dos KuDoms de inhibidor de Inter- α -tripsina, APP-I (KIDO88), un KuDom de colágeno, y tres KuDoms de TFPI-2 (SPRE94).

LACI

Inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteínas (LACI) es una fosfoglicoproteína de suero humano con un peso molecular de 39 kDa (secuencia de aminoácido en la Tabla 1) que contiene tres KuDoms. Nos referimos en lo sucesivo a la proteína como LACI y a los dominios Kunitz del mismo como LACI-K1 (residuos 50-107), LACI-K2 (residuos 121-178), y LACI-K3 (213-270). La secuencia de ADNc de LACI se reporta en WUNT88. GIRA89 reporta estudios mutacionales en los que se alteraron los residuos P1 de cada uno de los tres KuDoms. LACI-K1 inhibe Factor VIIa (F.VII_a) cuando F.VII_a está unido con el factor tisular y LACI-K2 inhibe Factor X_a. No se conoce si LACI-K3 inhibe nada. Ni LACI ni ninguno de los KuDoms de LACI es un inhibidor potente de la calicreína plasmática.

En una modalidad preferida de esta invención, los KuDoms son sustancialmente homólogos con LACI-K1, pero difieren en formas que confieren una fuerte actividad inhibidora de calicreína plasmática se discute a continuación. Otros KuDoms de esta invención son homólogos a otros KuDoms de origen natural, en particular a otros KuDoms humanos. Para uso en seres humanos, las proteínas de esta invención están diseñadas para ser altamente similares en secuencia a uno u otro KuDom humano para reducir el riesgo de provocar una respuesta inmune.

La variegación de una proteína se consigue típicamente mediante la preparación de una mezcla correspondientemente variegada de ADN (con codones variables que codifican residuos variables), la clonación en vectores adecuados, y expresando el ADN en células huésped adecuadas. Para cualquier molécula de proteína dada de la genoteca, la elección de aminoácido en cada residuo variable sujeto a las restricciones anteriores, es aleatoria, el resultado de la casualidad de que el ADN exprese esa molécula de proteína.

PRIMERO LA GENOTECA LACI-K1 CRIBADA PARA UNIÓN A PKA

Los solicitantes han cribado una primera gran genoteca de dominios LACI-K1 (patrón de variegación se muestra en la Tabla 21), con los resultados mostrados en la Tabla 3. En la Tabla 3, "Residuos genoteca" son los que admite que se produzca, de forma aleatoria, en esa posición, en la genoteca, y "Residuos Preferidos" son los que aparecen en esa posición en al menos una de las 10 variantes identificadas como la unión a la calicreína humana.

En los residuos 13, 16, 17, 18, 31, y 32, las selecciones son muy fuertes. En la posición 34, la selección de bien SER o THR es bastante fuerte. En la posición 39, la selección para GLY es fuerte. La posición 19 parece ser bastante tolerante.

Debe tenerse en cuenta que los Solicitantes no han secuenciado todos los aislamientos positivos en esta u otras las genotecas dadas a conocer en la presente invención, que algunas de las posibles proteínas mutantes pueden no haber estado presente en la genoteca en cantidades detectables, y que, en algunas posiciones, sólo algunos de los posibles aminoácidos se pretende que estén incluidos en la genoteca.

SEGUNDO GENOTECA DE LACI-K1 Y SELECCIÓN DE LOS NUEVOS INHIBIDORES DE CALICREÍNA

Los solicitantes prepararon una segunda genoteca LACI-K1, como se muestra en la Tabla 750. Esta genoteca usa la observación de la primera selección y permite la variabilidad en las posiciones 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, y 21. Los residuos en las posiciones 34 y 39 se fijaron en S₃₄ y G₃₉. Los seleccionados KK2/#1 a través de KK2/#13, como se muestra en la Tabla 2 se obtuvieron de la misma manera como se describe en la sección de Ejemplos para el primer cribado. Los solicitantes prepararon las proteínas KK2/#11 y KK2/#13 en *S. cerevisiae* en el sistema de Mata descrito en la presente

invención. Las mediciones preliminares indican que estas proteínas son inhibidores muy potentes de pKA con K_i de menos de 300 pM y probablemente menor de 100 pM.

5 Usando las secuencias seleccionadas y los datos de unión de KuDoms seleccionados, se puede escribir una receta para una alta afinidad KuDom inhibidor de pKA que se puede aplicar a otros KuDom parentales humanos. En primer lugar, el KuDom debe cumplir con los requisitos de la Tabla 14. Las sustituciones que se muestran en la Tabla 15 es probable que confieran alta afinidad de la actividad inhibidora de pKA en cualquier KuDom. Así, una proteína que contiene una secuencia que es un KuDom, como se muestra en la Tabla 14, y que contiene en cada una de las posiciones 12-21 y 32-39 un tipo de aminoácidos que se muestra en la Tabla 15 para esa posición es probable que sea un potente inhibidor de la pKA humana. 10 Con mayor preferencia, la proteína tendría un tipo de aminoácido que se muestra en la Tabla 15 para todas las posiciones indicadas en la Tabla 15. Para reducir el potencial para respuesta inmune, se debe usar una u otra KuDom humana como proteína parental para proporcionar la secuencia fuera de la región de unión.

15 Es probable que una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a uno de KK2/#13, KK2/#11, o KKII/3#6 a partir del residuo 5 al residuo 55 (como se muestra en la Tabla 2) y es idéntica a una de KK2/#13, KK2/#11, o KKII/3#6 en las posiciones 13-19, 31, 32, 34, y 39 pKA humano con una K_i de 5 nM o menos. KK2/#13, KK2/#11, y KKII/3#6 difieren de LACI-K1 en las posiciones 10, 8, y 7 respectivamente. No está claro que estas sustituciones son igualmente importantes fomentando la unión e inhibición de pKA. A partir de los inhibidores de pKA conocidos enumerados, se pueden preparar una serie de moléculas que se reviertan progresivamente hacia LACI-K1. Se espera que 20 las moléculas muestren menos afinidad por pKA pero además menos potencial para antigenicidad. Una persona experta en la técnica puede elegir a partir de esta colección una proteína de suficiente potencia y baja inmunogenicidad. También es posible que las sustituciones en uno de los inhibidores de pKA enumerados por aminoácidos que difieren de LACI-K1 puedan reducir la inmunogenicidad sin reducir la afinidad por pKA a un grado que hace que la proteína no sea apta para su uso como un medicamento.

25 Inhibidores Kudom de pKA DISEÑADOS

De aquí en adelante, "DKI" significará un PKA "Diseñado Inhibidor" que son KuDoms que incorporan información de la secuencia de aminoácidos de la serie SPI de moléculas, especialmente KK2/# 13, KK2/# 11, o KKII/3#6. Las secuencias de 30 varios DKIs y sus proteínas parentales se dan en la Tabla 2. De aquí en adelante, la declaración "las mutaciones XnnY₁, XnnY₂, ... pueden no ser necesarias" significa que cada una de las mutaciones podrían ser innecesarias separadamente. Es decir, la lista no es para ser tomado como un bloque que se aplicará en conjunto, sino como una lista de cosas para probar. Del mismo modo, las listas de mutaciones adicionales son para ser probadas por separado.

35 La proteína DKI-1.2.1 se basa en **LACI-K2** humano y se muestra en la Tabla 2. Las mutaciones P11G, I13R, Y17A, I18H, T19P, Y21W, R32E, K34S, y L39G probablemente confieren una alta afinidad por pKA. Algunas de estas sustituciones pueden no ser necesarias; particularmente, P11G y T19P pueden no ser necesarias. Otras mutaciones que podrían mejorar la afinidad por pKA incluyen E9A, D10E, G16A, Y21F, y L39E.

40 La proteína DKI-1.3.1 (Tabla 2) se basa en humano **LACI-K3**. Las mutaciones R11D, L13P, N17A, E18H, N19P, R31E, K34S, y S36G tienen por objeto conferir una alta afinidad por pKA. Algunas de estas sustituciones pueden no ser necesarias; particularmente, N19P puede no ser necesaria. Otros cambios que podrían mejorar K_D incluyen D10E, F21W y G39E.

45 La proteína DKI-2.1 (Tabla 2) está basada en el **α 3 KuDom colágeno humano**. Las mutaciones D16A, F17A, I18H, R32E, y W34S probablemente confieren alta afinidad por pKA. Algunas de estas sustituciones pueden no ser necesarias; particularmente, R32E puede no ser necesaria. Otras mutaciones que podrían mejorar la afinidad por pKA incluyen K9A, D10E, D16G, K20R, R32T, W34V, y G39E.

50 DKI-3.1.1 (Tabla 2) se deriva a partir de **Dominio 1 TFPI-2 Humano**. Los intercambios Y11G, L17A, L18H, R31E, y L34S probablemente confieren alta afinidad por pKA. La mutación L34S puede no ser necesaria. Otras mutaciones que podrían mejorar la afinidad por pKA incluyen Y21W, Y21F, Q32E, L34T, L34I, y E39G.

55 DKI-3.2.1 (Tabla 2) se deriva a partir de **dominio 2 TFPI-2 Humano**. Este dominio parental contiene inserciones después del residuo 9 (un residuo) y 42 (dos residuos). Las mutaciones E15R, G16A, S17a, T18H, E19P, K32T y F34V tienen por objeto conferir afinidad por pKA. Si uno necesita un inhibidor de pKA basado en dominio 2 de TFPI, una ruta preferida es hacer una genoteca de dominios que permiten las sustituciones dadas y muchos otros, y después seleccionar los aglutinantes.

DKI-3.3.1 (Tabla 2) se deriva a partir de **Dominio 3 TFPI-2 Humano**. Los intercambios L13H, S15R, y N17A, probablemente confieren alta afinidad por pKA. Otras mutaciones que podrían mejorar la afinidad por pKA incluyen D10E, T19Q, Y21W, T36G, y G39E.

5

DKI-4.1.1 (Tabla 2) es a partir de **ITI-K1 humano** por la afirmación de S10D, M15R, M17a, T18H, Q34S, y M39G. Las mutaciones M39G y Q34V pueden no ser necesarias. Otras mutaciones que podrían mejorar la afinidad por pKA incluyen: G16A, M17N, S19Q, Y21W, y Y21F.

10

DKI-4.2.1 (Tabla 2) es a partir de **ITI-K2 humano** a través de las mutaciones V10D, R11D, F17A, I18H, V31E, L32E, P34S, y Q39E. Las mutaciones V31E, L32E, y Q39E podrían no ser necesarias. Otras mutaciones que podrían mejorar la afinidad por pKA incluyen: V10E, Q19P, L20R, W21F, P34I, y Q39G. DKI-4.2.2 tiene ocho mutaciones: V10D, R11D, F17A, I18H, L20R, V31E, L32E y P34S.

15

DKI-5.1 se deriva de APP-I humano (conocido además como la Proteasa Nexina-II) por mutaciones M17A, I18H, S19P, A31E, y P32E y es probable que sea un potente inhibidor de pKA. Las mutaciones S19P, A31E y P32E pueden no ser necesarias. Otras mutaciones que podrían mejorar la afinidad por pKA incluyen T11D.

20

DKI-6.1 se deriva a partir de **HKI B9 KuDom NORR93**) por las cinco sustituciones: K11D, Q15R, T16A, M17A, M18H, T19P, y L32E. DKI-6.1 probablemente sea un potente inhibidor de pKA. Las mutaciones L32E, y T19P podrían no ser necesarias.

25

Aunque el BPTI no es un inhibidor especialmente bueno de pKA, podría convertirse en uno. DKI-7.1 se deriva de BPTI por las mutaciones Y10E, K15R, R17A, R118H, I19P, Q31E, T32E, y R39E que probablemente aumenten la afinidad por pKA. Las mutaciones Y10E, K15R, I19P, Q31E, T32E y R39E pueden no ser necesarias; las mutaciones realmente importantes son R17A y R118H.

MODIFICACIÓN DE DOMINIOS KUNITZ

30

Los KuDoms son bastante pequeños; si esto debe causar un problema farmacológico, tales como la eliminación excesivamente rápida de la circulación, dos o más de tales dominios se pueden unir. Un enlazador preferido es una secuencia de uno o más aminoácidos. Un enlazador preferido es uno que se encuentra entre los dominios repetidos de una proteína humana, especialmente los enlazadores que se encuentran en BPTI homólogos humanos, uno de los cuales tiene dos dominios (BALD85, ALBR83a, ALBR83b) y otro de los cuales tiene tres (WUNT88). Los enlazadores peptídicos tienen la ventaja de que toda la proteína puede entonces ser expresada por técnicas de ADN recombinante. También es posible usar un enlazador peptídico, tales como uno de los usados comúnmente para formar conjugados inmunogénicos. Un medio alternativo para incrementar la residencia de suero de un KuDom similar a BPTI es unirlos a polietilenglicol, llamado PEGilación (DAVI79).

35

40

FORMAS DE MEJORAR LA ESPECIFICIDAD DE, POR EJEMPLO, KKII/3#7, KK2/#11, Y KK2/#13 PARA LA CALICREÍNA PLASMÁTICA:

45

Debido a que hemos hecho una gran parte de la superficie de KKII/3#6, KK2/#11, y KK2/#13 complementaria a la superficie de la pKA, R₁₅ no es esencial para la unión específica a pKA. Muchas de las enzimas en las rutas de coagulación y fibrinolíticas cortan preferentemente después de Arg o Lys. No tener un residuo básico en la posición P1 puede dar lugar a una mayor especificidad. La variante de KKII/3#7-K15A (se muestra en la Tabla 27), que tiene un ALA en P1, probablemente sea un buen inhibidor de pKA y puede tener mayor especificidad para pKA con relación a otras proteasas que KKII/3#7. La afinidad de KKII/3#7-K15A por pKA probablemente sea menor que la afinidad de KKII/3#7 por pKA, pero la pérdida de afinidad por otras enzimas que prefieren Arg/Lys probablemente sea mayor y, en muchas aplicaciones, la especificidad es más importante que la afinidad. Otros mutantes que son propensos a tener buena afinidad y muy alta especificidad incluyen KK2/#13-R15A y KK2/#11-R15S. Este enfoque se podría aplicar a otros inhibidores de la pKA de alta afinidad.

50

MODO DE PRODUCCIÓN

55

Las proteínas de esta invención pueden producirse mediante cualquier técnica convencional, incluyendo

- (a) la síntesis no biológica mediante acoplamiento secuencial de aminoácidos componentes,
- (b) la producción por técnicas de ADN recombinante en una célula huésped adecuada, y

(c) eliminación de secuencias no deseadas de LACI y acoplamiento de las secuencias sintéticas de reemplazo

5 Las proteínas descritas en la presente invención se producen preferiblemente, de manera recombinante, en un huésped adecuado, tales como bacterias de los géneros *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Erwinia*, y levaduras de los géneros *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhinosporidium*, *Saccharomyces*, y *Schizosaccharomyces*, o células de mamífero cultivadas, tales como células COS-1. Los huéspedes más preferidos son los microorganismos de las especies *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* y *Yarrowia lipolytica*. Cualquier promotor, regulable o constitutivo, que es funcional en el huésped se puede usar para controlar la expresión génica.

10 Preferentemente las proteínas son secretadas. Con la máxima preferencia, las proteínas se obtuvieron a partir de medio condicionado. No se requiere que las proteínas descritas en la presente invención sean secretadas. La secreción es la ruta preferida porque las proteínas son más propensas a plegarse correctamente, se pueden producir en medio condicionado con pocos contaminantes, y es menos probable que sea tóxico para las células huésped. La secreción no es necesaria.

15 A menos que haya una razón específica para incluir glicogrupos, preferimos las proteínas diseñadas para carecer de sitios de N glicosilación unidos para reducir la posibilidad de que la antigenicidad de los glicogrupos y por lo que las proteínas equivalentes pueden expresarse en una amplia variedad de organismos incluyendo: 1) *E. coli*, 2) *B. subtilis*, 3) *P. pastoris*, 4) *S. cerevisiae*, y 5) células de mamíferos.

20 Existen varios medios para reducir el problema de las células huésped que producen proteasas que degradan el producto recombinante; ver, *entre otros* BANE90 y BANE91. VAND92 reporta que la sobreexpresión de la peptidasa señal de *B. subtilis* en *E. coli* provoca un aumento de la expresión de una proteína de fusión heteróloga. ANBA88 reporta que la adición de PMSF (un inhibidor de serina proteasas) al medio de cultivo mejoró el rendimiento de una proteína de fusión.

25 Otros factores que pueden afectar a la producción de éstas y otras proteínas descritas en la presente invención incluyen: 1) el uso de codones (se prefiere optimización de codones para el huésped), 2) secuencia señal, 3) secuencia de aminoácido en sitios de procesamiento destinados, presencia y localización de procesamiento de enzimas, delección, mutación o la inhibición de varias enzimas que pudieran alterar o degradar el producto diseñado y las mutaciones que hacen que el huésped sea más permisivo en la secreción (se prefieren huéspedes de secreción permisiva).

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

40 PREPARACIÓN DE PÉPTIDOS

La síntesis química de polipéptidos es un área de rápida evolución en la técnica, y están bien descritos los métodos de síntesis de polipéptidos en fase sólida en las siguientes referencias, por la presente incorporada en su totalidad como referencia: (Merrifield, *J Amer Chem Soc* 85:2149-2154 (1963); Merrifield, *Science* 232:341-347 (1986); Wade y otros, *Biopolymers* 25:S21-S37 (1986); Fields, *Int J Polypeptide Prot Res* 35:161 (1990); MilliGen Report Nos. 2 y 2a, Millipore Corporation, Bedford, MA, ((1987); Ausubel y otros, *supra*, y Sambrook y otros, *supra*). Tan y Kaiser (*Biochemistry*, 1977, 16:1531-41) sintetizaron BPTI y un homólogo hace dieciocho años.

50 Como se conoce en la técnica, tales métodos implican el bloqueo o la protección de grupos funcionales reactivos, tales como grupos amino, carboxilo y grupos tio. Después de la formación del enlace polipéptido, se eliminan los grupos protectores. Así, la adición de cada residuo de aminoácido requiere varias etapas de reacción para proteger y desproteger. Los métodos actuales usan síntesis en fase sólida, en donde el aminoácido C-terminal está unido covalentemente a partículas de resina insolubles que se pueden filtrar. Los reactivos se eliminan por lavado de las partículas de resina con disolventes apropiados usando una máquina automatizada. Varios métodos, incluyendo el método "tBoc" y el método "Fmoc" son bien conocidos en la técnica. Véase, *entre otros*, Atherton y otros, *J Chem Soc Perkin Trans* 1:538-546 (1981) y Sheppard y otros, *Int J Polypeptide Prot Res* 20:451-454 (1982).

55 ENSAYOS PARA LA UNIÓN E INHIBICIÓN DE LA CALICREÍNA PLASMÁTICA

Cualquier método adecuado puede ser usado para probar los compuestos de esta invención. Scatchard (Ann NY Acad Sci (1949) 51:660-669) describió un método clásico de medición y análisis de unión que es aplicable a la proteína de unión. Este método requiere proteína relativamente pura y la capacidad de distinguir la proteína unida de la no unida.

5 Un segundo método adecuado para la medición de K_D es medir la actividad inhibidora contra la enzima. Si la K_D a medir está en el rango de 1 nM a 1 M, este método requiere sustratos cromogénicos o fluorogénicos y decenas de microgramos a miligramos de inhibidor relativamente puro. Para las proteínas de esta invención, que tienen K_D en el intervalo de 5 nM a 50 pM, nanogramos a microgramos de inhibidor son suficientes. Al usar este método, la competencia entre el inhibidor y el sustrato de la enzima puede dar una K_i medida que es más alta que la verdadera K_i . La medición reportada aquí no está tan
10 corregida porque la corrección sería muy pequeña y la corrección reduciría la K_i . Aquí, usamos la K_i medida como una medida directa de K_D .

Un tercer método para determinar la afinidad de una proteína por un segundo material es tener la proteína mostrada en un empaque genético, tal como M 13, y medir la capacidad de la proteína de adherirse a un "segundo material" inmovilizado.
15 Este método es altamente sensible debido a que los empaques genéticos pueden amplificarse. Obtenemos al menos valores semicuantitativos para las constantes de unión mediante el uso de un gradiente escalonado de pH. Los inhibidores de afinidad conocida por la proteasa se usan para establecer los perfiles estándar contra el que se juzga a otros inhibidores expuestos en fagos. Cualquier otro método adecuado de medición de la unión a proteínas puede ser usado.

20 Preferentemente, las proteínas de esta invención tienen una K_D para pKA de como mucho aproximadamente 5 nM, más preferiblemente a lo sumo aproximadamente 300 pM, y la mayoría preferentemente 100 pM o menos. Preferentemente, la unión es inhibidora de modo que la K_i es la misma que K_D . La K_i de KKII/3#6 es de aproximadamente 300 pM y la K_i s de KK2/#11 y KK2/#13 son menor de 300 pM y probablemente menor de 100 pM.

25 MÉTODOS Y PREPARACIONES FARMACÉUTICAS

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

30 En la presente invención, "protección" incluye "prevención", "supresión", y "tratamiento". "Prevención" implica la administración de drogas antes de la inducción de la enfermedad. "Supresión" implica la administración de drogas antes de la aparición clínica de la enfermedad. "Tratamiento" consiste en la administración de drogas después de la aparición de la enfermedad.

35 En la medicina humana y veterinaria, puede que no sea posible distinguir entre "prevención" y "supresión", ya que el evento(s) inductivo puede ser desconocido o latente, o el paciente no se percata hasta después de la ocurrencia del evento inductivo(s). Usamos el término "profilaxis", a diferencia de "tratamiento" para abarcar "prevención" y "supresión". En la presente invención, "protección" incluye "profilaxis". La protección no necesita ser absoluta para ser útil.

40 Las proteínas de esta invención se pueden administrar, por cualquier medio, sistémico o tópico, para proteger a un sujeto contra una enfermedad o condición adversa. Por ejemplo, la administración de tal composición puede ser por cualquier vía parenteral, por inyección en bolo o por perfusión gradual. Alternativa o simultáneamente, la administración puede ser por vía oral. Un régimen adecuado comprende la administración de una cantidad eficaz de la proteína, administrada como una dosis
45 única o como varias dosis durante un período de horas, días, meses o años.

La dosis adecuada de una proteína de esta invención puede depender de la edad, sexo, salud, y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, frecuencia de tratamiento, y el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación más preferida puede ser adaptada para el sujeto individual, como se entiende y determinable por un experto en la materia, sin
50 experimentación indebida mediante el ajuste de la dosis de maneras conocidas en la materia.

Para los métodos de los ensayos preclínicos y clínicos de medicamentos, incluyendo proteínas, véase, por ejemplo, Berkow y otros, eds., The Merck Manual, 15va edición, Merck y Co., Rahway, N.J., 1987; Goodman y otros, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8va edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (1990); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3ra edición, ADIS Press, LTD., Williams and Wilkins, Baltimore, MD. (1987), Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston, (1985),
55

Adicionalmente a una proteína descrita aquí, una composición farmacéutica puede contener vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes o auxiliares. Véase, *por ejemplo*, Berker, *supra*, Goodman, *supra*, Avery, *supra* y Ebadi, *supra*.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO Y REACTIVOS

Las proteínas de esta descripción se pueden aplicar *in vitro* para cualquier muestra adecuada que podría contener la calicreína plasmática para medir la pKA presente. Para ello, el ensayo debe incluir un Sistema de Producción de Señal (SPS) que proporcione una señal detectable que depende de la cantidad presente de pKA. La señal se puede detectar visualmente o instrumentalmente. Las posibles señales pueden incluir la producción de productos de color, fluorescentes, luminiscentes, alteración de las características de absorción o emisión de radiación por un componente o producto de ensayo, y precipitación o aglutinación de un componente o producto.

El componente de la SPS más íntimamente asociado con el reactivo de diagnóstico se denominada la "etiqueta". Una etiqueta puede ser, *por ejemplo.*, un radioisótopo, un fluoróforo, una enzima, una co-enzima, un sustrato enzimático, un compuesto denso en electrones, o una partícula aglutinable. Un isótopo radiactivo se puede detectar mediante el uso de, por ejemplo, un contador y o un contador de centelleo o por autorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles son ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{14}C , y, preferentemente, ^{125}I . Además es posible marcar un compuesto con un compuesto fluorescente. Cuando el compuesto marcado con fluorescencia se expone a luz de la longitud de onda apropiada, su presencia puede ser detectada. Entre los compuestos de marcaje fluorescente más comúnmente usados están isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina. Alternativamente, metales emisores de fluorescencia, tales como ^{125}Eu u otros lantánidos, (se pueden unir a la proteína de unión usando tales grupos de metal como el ácido dietilentriaminopentaacético o ácido etilendiaminotetraacético quelante. Las proteínas también pueden ser marcadas de manera detectable por acoplamiento a un compuesto quimioluminiscente, como luminol, isolumino, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio, y éster oxalato. Del mismo modo, un compuesto bioluminiscente, tales como la luciferina, luciferasa y aequirina, puede ser usado para etiquetar la proteína de unión. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina por la detección de luminiscencia. Se prefieren etiquetas de enzima, tales como la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina.

Hay dos tipos básicos de los ensayos: heterogéneos y homogéneos. En los ensayos heterogéneos, la unión de la molécula de afinidad al analito **no** afecta a la etiqueta; así, para determinar la cantidad de analito, la etiqueta unida debe ser separada de la etiqueta libre. En los ensayos homogéneos, la interacción **hace** que se afecte la actividad de la etiqueta, y el analito se puede medir sin separación.

En general, una proteína de unión a calicreína (KBP) puede ser usada para el diagnóstico de la misma manera que se usa un anticuerpo anti-pKA. Así, dependiendo del formato de ensayo, puede ser usado para ensayar pKA, o, por inhibición competitiva, otras sustancias que se unen a pKA.

La muestra será normalmente un fluido biológico, tales como sangre, orina, linfa, semen, leche o líquido cefalorraquídeo, o un derivado del mismo, o un tejido biológico, *por ejemplo.*, una sección de tejido u homogeneizado. La muestra puede ser cualquier cosa. Si la muestra es un fluido biológico o tejido, puede ser tomada de un humano u otro mamífero, vertebrado o animal, o a partir de una planta. La muestra preferida es sangre, o una fracción o derivado de la misma.

En un caso, la proteína que se une a pKA (KBP) se inmoviliza, y al pKA en la muestra se le permite competir con una cantidad conocida de un análogo de pKA etiquetado o específicamente etiquetables. El "análogo de pKA" es una molécula capaz de competir con un pKA para la unión a la KBP, que incluye en sí a pKA. Puede tener el nombre ya, o puede ser etiquetado posteriormente por unirse específicamente la etiqueta a un resto diferenciando el análogo de pKA de pKA. Las fases se separaron, y se cuantificó el análogo de pKA marcado en una fase.

En un "ensayo de sándwich", se emplean tanto un agente de unión insolubilizado pKA (KBA), como un KBA marcado. El analito pKA es capturado por el KBA insolubilizado y es marcado por la KBA marcado, formando un complejo terciario. Los reactivos pueden añadirse a la muestra en cualquier orden. Los KBAs pueden ser el mismo o diferentes, y sólo una KBA necesita ser un KBP de acuerdo con esta invención (el otro puede ser, *por ejemplo.*, un anticuerpo). La cantidad de KBA marcado en el complejo terciario es directamente proporcional a la cantidad de pKA en la muestra.

Los dos casos descritos anteriormente son los dos ensayos heterogéneos. Un ensayo homogéneo requiere sólo que la etiqueta se vea afectada por la unión de la KBP a pKA. El analito pKA puede actuar como su propia etiqueta si se usa un inhibidor de pKA como reactivo de diagnóstico.

Una etiqueta se puede conjugar, directa o indirectamente (*por ejemplo.*, a través de un anticuerpo anti-KBP marcado), covalente (*por ejemplo.*, con SPDP) o no covalentemente, a la proteína de unión a pKA, para producir un reactivo de

diagnóstico. Del mismo modo, la proteína de unión a pKA se puede conjugar a un soporte de fase sólida para formar una fase sólida ("captura") de reactivo diagnóstico. Los soportes adecuados incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, y magnetita. El vehículo puede ser soluble en cierta medida o insoluble. El material de soporte puede tener cualquier estructura siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a la pKA.

5

USOS DIAGNÓSTICOS IN VIVO

Un dominio Kunitz que se une fuertemente a pKA se puede usar para formación de imágenes *in vivo*. El diagnóstico por imágenes de focos de la enfermedad era considerada una de las mayores oportunidades comerciales para los anticuerpos monoclonales, pero esta oportunidad no se ha logrado. A pesar del considerable esfuerzo, sólo dos agentes de imagen basados en anticuerpos monoclonales han sido aprobados. Los decepcionantes resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales se deben en gran medida a:

10

- i) Afinidad y/o especificidad inadecuada;
- ii) Escasa penetración a sitios diana;
- iii) Lenta eliminación en sitios que no son diana;
- iv) Inmunogenicidad (la mayoría son murinos); y
- v) Alto costo de producción y poca estabilidad.

15

Estas limitaciones han llevado a la mayoría en el campo de diagnóstico por imagen a empezar a desarrollar agentes de imagen basados en péptidos. Mientras que potencialmente resuelven los problemas de escasa penetración y aclaramiento lento, los agentes de imagen basados en péptidos es poco probable que posean una adecuada afinidad, especificidad y estabilidad *in vivo* para ser útil en la mayoría de aplicaciones.

20

Las proteínas manipuladas se adecuan perfectamente a los requisitos de un agente de imagen. Particularmente la extraordinaria afinidad y especificidad que se puede obtener manipulando los dominios pequeños, estables de proteínas de origen humano que tengan tasas de eliminación y mecanismos conocidos *in vivo* se combinan para proporcionar más temprano, resultados más fiables, menos toxicidad/efectos secundarios, menor costo de producción y almacenamiento, y una mayor comodidad de preparación de etiquetas. De hecho, debería ser posible conseguir el objetivo de la formación de imágenes en tiempo real con agentes de formación de imágenes de proteínas manipuladas. Así, una proteína de unión a calicreína, por ejemplo, KKII/3#6, KK2/#11, y KK2/#13 puede usarse para localizar los sitios de de excesiva actividad de pKA.

25

30

La proteína de unión radiomarcada se puede administrar al sujeto humano o animal. La administración es típicamente por inyección, *por ejemplo*, intravenosa o arterial u otros medios de administración en una cantidad suficiente para permitir la posterior formación de imágenes dinámicas y/o estáticas usando dispositivos de de radio detección adecuados. La dosificación es la menor cantidad capaz de proporcionar una imagen eficaz para el diagnóstico, y puede ser determinada por medios convencionales en la materia, usando agentes de formación de radio imágenes conocidas como guías.

35

Típicamente, la formación de imágenes se lleva a cabo en todo el cuerpo del sujeto, o en esa parte del cuerpo u órgano relevante para la condición o enfermedad en estudio. La proteína de unión radiomarcada se ha acumulado. La cantidad de proteína de unión radiomarcada acumulada en un punto dado en el tiempo en los órganos diana pertinentes puede ser cuantificada.

40

Un dispositivo de radio detección particularmente adecuado es una cámara de centelleo, tal como una cámara γ . El dispositivo de detección de la cámara detecta y registra (y opcionalmente digitaliza) la desintegración radiactiva. La información digitalizada puede ser analizada de cualquier modo adecuado, muchos de los cuales son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un análisis de tiempo-actividad puede ilustrar a través de la captación de eliminación de la proteína de unión marcada radiactivamente por los órganos diana con el tiempo.

45

50

Varios factores se tienen en cuenta en la selección de un radioisótopo adecuado. El isótopo se seleccionó: para permitir una buena resolución de calidad en la imagen, para ser seguro para el uso diagnóstico en seres humanos y animales, y, preferentemente, para tener una vida media corta con el fin de disminuir la cantidad de radiación recibida por el cuerpo. El radioisótopo usado preferentemente debe ser farmacológicamente inerte, y las cantidades administrada no deben tener efecto fisiológico sustancial. La proteína de unión puede estar radiomarcada con diferentes isótopos de yodo, por ejemplo ^{123}I , ^{125}I , o ^{131}I (véase, por ejemplo, Estados Unidos Patente 4,609,725). La cantidad de etiquetado debe ser supervisada adecuadamente.

55

- 5 En las aplicaciones a los sujetos humanos, puede ser deseable usar otros radioisótopos que ^{125}I para el etiquetado para disminuir la exposición de dosimetría total del cuerpo y para optimizar la detectabilidad de la molécula marcada. Teniendo en cuenta la disponibilidad clínica listo para su uso en seres humanos, los marcadores radiactivos preferidos incluyen: $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{90}Y , ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re o ^{211}At . La proteína radiomarcada se puede preparar por diversos métodos. Estos incluyen la radio-halogenación por la cloramina-T o método de la lactoperoxidasa y la posterior purificación por cromatografía líquida de alta presión, por ejemplo, véase Gutkowska y otros en "Endocrinology and Metabolism Clinics of America: (1987) 16 (I):183. Otros métodos de radiomarcado se pueden usar, tales como IODOBEADS™.
- 10 Una proteína radiomarcada se puede administrar por cualquier medio que permita al agente activo alcanzar el sitio de acción del agente en un mamífero. Como las proteínas están sujetos a la digestión cuando se administran por vía oral, la administración parenteral, es *decir*, subcutánea intravenosa, intramuscular, normalmente se usaría para optimizar la absorción.
- 15 Inhibidores de alta afinidad, con alta especificidad son también útiles para diagnóstico *in vitro* de exceso de actividad de pKA humana.

Otros Usos

- 20 Las proteínas de unión a calicreína de esta descripción también se pueden usar para purificar calicreína de un fluido, *por ejemplo*, sangre. Para ello, el KBP se inmoviliza preferentemente sobre un soporte. Dichos soportes, incluyen los ya mencionadas como útiles para preparar reactivos de diagnóstico en fase sólida.
- 25 Las proteínas pueden usarse como marcadores de peso molecular de preferencia en la separación o purificación de proteínas. Las proteínas pueden necesitar ser desnaturalizadas para servir como marcadores de peso molecular. Una segunda utilidad general para las proteínas es el uso de proteína hidrolizada como una fuente de nutrientes. Las proteínas también pueden usarse para aumentar la viscosidad de una solución.
- 30 Las proteínas de esta descripción se pueden usar para cualquiera de los fines anteriores, así como para fines terapéuticos y de diagnóstico como se discute más anteriormente en esta especificación.

EJEMPLO 1: CONSTRUCCIÓN DE LA PRIMERA GENOTECA LACI-K1

- 35 Un dúplex oligonucleótido sintético que tiene extremos *Nsi*I- y *Mlu*I-compatibles fue clonado en un vector parental (LACI:III) anteriormente escindido con las dos enzimas anteriores. El material ligado resultante se transfectó por electroporación en la cepa XLIMR de (F) *Escherichia coli* y se sembraron en placas de Amp para obtener fagos generadores de colonias Ap^R. El esquema de variegación de la Fase 1 se centra en la región P1, y afectó a los residuos 13, 16, 17, 18 y 19. Permitted 6.6×10^5 secuencias de ADN diferentes (3.1×10^5 secuencias de proteínas diferentes). La genoteca obtenida consistió en 1.4×10^6 ufc independientes que aproximadamente representa el doble de toda la genoteca. El stock de fago generado a partir de este plaqueado dio un título total de 1.4×10^{13} pfu en aproximadamente 3,9 ml, con cada clon independiente que representa, en promedio, 1×10^7 en total y 2.6×10^6 veces por ml de stock de fago.
- 40

Para permitir la variegación de los residuos 31, 32, 34 y 39 (fase II), dúplex de oligonucleótidos sintéticos con *extremos Mlu*I- y *Bst*EII- compatibles se clonaron en ADN previamente escindido R_f derivado a partir de una de las siguientes

- 45
- i) la construcción parental,
 - ii) la fase I de la genoteca, o
 - iii) fagos de exposición seleccionados a partir de la primera fase de la unión a una diana determinada.
- 50 El esquema variegación de la fase II permite 4096 secuencias de ADN diferentes (1600 secuencias de proteínas diferentes) debido a alteraciones en los residuos 31, 32, 34 y 39. La fase final II de variegación es dependiente del nivel de variegación restante después de las tres rondas de unión y elución con una diana determinada en la fase I.
- 55 La posible variegación combinada para ambas fases es igual a 2.7×10^8 secuencias de ADN diferentes o 5.0×10^7 secuencias de proteínas diferentes. Cuando se usan fagos de exposición seleccionados previamente como el origen de R_f ADN para la variegación de fase II, el nivel final de variegación está probablemente en el rango de 10^7 a 10^6 .

Ejemplo 2: Tamizaje de genoteca de LACI (K1) para la unión a Calicreína

5 El esquema general para la selección de una variante LACI-K1 para unirse a una proteasa dada implica la incubación de la
 10 genoteca de fagos de exposición con perlas de calicreína de interés en una solución tamponada (PBS que contiene 1 mg/ml
 de BSA), seguido de un lavado que elimina la variante de fagos de exposición no unida y pobremente retenida con PBS que
 contiene 0,1% de Tween 20. Las perlas de calicreína se hicieron mediante el acoplamiento de la calicreína plasmática
 humana (Calbiochem, San Diego, CA, # 420302) a perlas de agarosa usando Reactigel (6x) (Pierce, Rockford, D, #202606).
 Los fagos de exposición más fuertemente unidos se eluyeron con un tampón de elución de pH bajo, típicamente el tampón
 citrato (pH 2.0) que contiene 1 mg/ml de BSA, que se neutralizó inmediatamente con tampón Tris a pH 7.5. Este proceso
 constituye una sola ronda de selección. Los fagos de exposición eluidos neutralizados se pueden usar ya sea:

- 15 i) para inocular una cepa F⁺ de *E. coli* para generar un nuevo stock de fagos de exposición, que se usará para
 posteriores rondas de selección (el llamado tamizaje convencional), o
- ii) ser usado directamente para otra ronda inmediata de selección con las perlas de la proteasa (los llamados de tamizaje
 rápido).

20 Típicamente, tres rondas de cualquiera de los métodos, o una combinación de los dos, se realizan para dar lugar a los fagos
 de exposición finales seleccionados en la que se secuenció y analizó un número representativo para propiedades de unión,
 ya sea como grupos de fagos de exposición o como clones individuales.

25 Se realizaron dos fases de selección, cada una compuesto de tres rondas de unión y elución. La selección de fase I usa la
 fase I de la genoteca (residuos variegados 13, 16, 17, 18 y 19), que pasó por tres rondas de unión y elución contra una
 proteasa diana dando lugar a una subpoblación de clones. El ADN R_i derivado de esta subpoblación seleccionada se usó
 para generar la genoteca de la Fase II (adición de restos variegados 31, 32, 34 y 39). Los 1.8 x 10⁷ transformantes
 independientes se obtuvieron para cada una de las genotecas de la fase II. Las genotecas de la fase II se sometieron a
 otras tres rondas de unión y elución con la misma proteasa diana dando lugar a los seleccionados finales.

30 Después de dos fases de selección contra de perlas de calicreína-agarosa de plasma humano se secuenció un número (10)
 de la selección final de fagos de exposición. Las secuencias de aminoácidos se muestran en la Tabla 2, entradas KBPcon1 a
 través de KKII/3#C.

35 La Tabla 23 muestra que KkII/3(D) es un inhibidor altamente específico de la Calicreína humana. Los fagos que muestren
 KkII/3(D) el derivado de LACI-K1 se unen a perlas de calicreína al menos 50 veces más de lo que se une a otras dianas de
 la proteasa.

Las mediciones preliminares indican que KKII/3#6 es un potente inhibidor de la pKA con K_i probablemente menos de 500
 pM.

40 EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS CINÉTICO.

Los tres aislamientos KKII/3#6, KK2/#11, y KK2/#13 se volvieron a clonar en un vector de expresión de levadura. El vector
 de expresión de levadura se deriva a partir de pMFalpha8 (KURJ82 y MIYA85). Los genes variantes de LACI se fusionaron
 a parte del gen *matα1*, generando un gen híbrido que consiste en *matα1* promotor-péptido señal y secuencia líder fusionado
 a la variante LACI. El sitio de clonación se muestra en la Tabla 24. Nótese que la proteína variante LACI-K1 procesada
 45 correctamente debe ser lo más detallada en la Tabla 2 con la adición de residuos de glu-ala-ala-glu a la met N-terminal
 (residuo I en la Tabla 2). Expresión en *S. cerevisiae* dio un rendimiento aceptable típico de este sistema. LACI (dominio
 kunitz 1) expresado en levadura, BPTI y variantes LACI: KKII/3#6, KK2/#11, y KK2/#13 se purificaron mediante
 cromatografía de afinidad usando perlas tripsina-agarosa.

50 Para la producción a gran escala, *Pichia pastoris* es un huésped preferido. El sistema producción más preferido en *P.*
pastoris es el sistema alcohol oxidasa. Otros han producido una serie de proteínas en la levadura *Pichia pastoris*. Por
 ejemplo, Vedvick y otros. (VEDV91) y Wagner y otros.(WAGN92) produjeron aprotinina a partir del promotor de la alcohol
 oxidasa con la inducción por metanol como una proteína secretada en el medio de cultivo a ≈1 mg/ml. Gregg y otros.
 (GREG93) han revisado la producción de un número de proteínas en *P. pastoris*. La Tabla 1 de GREG93 muestra proteínas
 55 que se han producido en *P. pastoris* y los rendimientos.

TABLA 1: Secuencia de toda LAC1:

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

1 5 5 5 5 5

1 MIYTMKKVHA LWASVCLLLN LAPAPLNAds eedehtiit dtelpplklM
 51 HSFCAFKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFESLEEC
 101 KKMCTRDnan riikttlqge kpdfcfleed pgicrgyitr yfynnqtkqc
 151 erfkyggclg nmnnfetlee cknicedgpn gfqvdnygtq lnavnsltp
 201 qstkvpslfe fhgpswcltp **adrglcrane** nrfyynsvig **kcrpfkygsc**
 251 **ggnennftsk** **qeclrackkg** fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif
 301 vknm (Sec. con núm. de ident. 18)

20 La secuencia señal (1-28) está en mayúscula y subrayada LACI-K1 está en mayúscula LACI-K2 está subrayada LACI-K3 está en negrita

La TABLA 2 está más abajo.

25

Tabla 3: Resumen de la primera selección de dominios LACI-K1 para la unión a pKA.

BPTI #	(Lac I)	Genoteca de Residuos	Residuos Preferidos
13	P	LHPR	HP
16	a	AG	AG
17	I	FYLHINA	NSA
		SCPRTVD	
		G	
18	M	ALL	HL
19	K	LWQMKAG	QLP
		SPRTVE	
31	E	Eq	E
32	E	Eq	Eq
34	I	ALL	STI
39	E	ALL	GEA

ES 2 514 615 T3

Tabla 2: Secuencias de dominios Kunitz, algunos de los cuales inhiben la pKA humana.

	Secuencia de aminoácidos	
	11111111112222222222333333333344444444445555555555	
5	Identificación 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	sec. con núm. de ident..
	BPTI RPDFCLEPPYTGPKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA	sec. con núm. de ident. 2
	LACI-K1 mhsfcfkaddgpckaimkrffniftrqceefiyggcegnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 3
10	KBPconI mhsfcfkaddgHckaNHQrffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 4
	KKII/3#1 mhsfcfkaddgHckASLPrffniftrqEEfIyggcEgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 5
	KKII/3#2 mhsfcfkaddgPckANHLrffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 6
15	KKII/3#3 mhsfcfkaddgHckANHLrffniftrqEEfTyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 7
	KKII/3#4 mhsfcfkaddgHckANHLrffniftrqEEfTyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 8
	KKII/3#5 mhsfcfkaddgHckASLPrffniftrqEEfIyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 9
20	KKII/3#6 mhsfcfkaddgHckANHLrffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident.10
	KKII/3#7 mhsfcfkaddgHckANHLrffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 11
	KKII/3#8 mhsfcfkaddgHckANHLrffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 12
25	KKII/3#9 mhsfcfkaddgHckANHLrffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 13
	KKII/3#10 mhsfcfkaddgHckGAHLrffniftrqEEfIyggcEgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 14
30	KKI/3(a) mhsfcfkaddgRckGAHLrffniftrqceefiyggcegnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 15
	KKI/3(b) mhsfcfkaddgPckAIHLrffniftrqceefiyggcegnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 16
35	KKII/3#C mhsfcfkaddgHckANHLrffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 17
	KK2/#13 mhsfcfkaDGgRcRGAHPWffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 19
40	KK2/#14 mhsfcfkaDGgRcRGAHPWffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 20
	KK2/#5 mhsfcfkaDDgPcRAAHPWffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleecklanctrd	sec. con núm. de ident. 21
45	KK2/#11 mhsfcfkaDDgPcRAAHPWffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 22
	KK2/#1 mhsfcfkaDVgRcRGAHPWffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 23
	KK2/#4 mhsfcfkaDVgRcRGAQPrFffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 24
50	KK2/#6 mhsfcfkaDDgScRAAHLrWffniftrqEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 25

55

ES 2 514 615 T3

5	KK/#10	mhsfcafkaEGgScRAAHQrWffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 26
	KK2/#8	mhsfcafkaDDgPcRGAHLrFffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 27
	KK2/#3	mhsfcafkaDDgHcRGALPrWffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 28
	KK2/#9	mhsfcafkaDSgNcRGNLPrFffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 29
	KKV#7	mhsfcafkaDSgRcRGNHQRffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 30
10	K2/#12	mhsfcafkaDGgRcRAIQPrWffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 31
	KK2con1	mhsfcafkaDDgRcRGAHPPrWffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfsleeckmctrd	sec. con núm. de ident. 32
	LACI-K2 Humano	KPDFCFLEEDPGICRGYITRYFYNNQTKQCERFKYGGCLGNMNNFETLEECKNICEDG	sec. con núm. de ident. 33
15	DKI-1.2.1	kpdfcflcedGgRcrgAHPPrWfynntkqceEfSyggcGgnmnnfleecknicedg	sec. con núm. de ident. 34
	LACI-K3 Humano	GPSWCLTPADRGLCRANENRFYNSVIGKCRPFKYSGGCGNENNFSTKQCELRACKKG	sec. con núm. de ident. 35
	DKI-1.3.1	gpswcltpadDgPcraAHPPrfyynsvigkcEpfSysggcggnennftskqeclrackkg	sec. con núm. de ident. 36
20	Colágeno Humano KuDom α3	ETDICKLPKDEGTCDRDFILKWYDPNTKSCARFWYGGCGNENKFGSQKECEKVCAPV	sec. con núm. de ident. 37
	DKI-2.1	etdicklpkdegtrAAHlkwydpntkscaEfSyggcggnenkfgsqkecekvcapv	sec. con núm. de ident. 38
25	TFPI-2 DOMINIO 1	NAEICLLPLDYGPCRALLLRYYYDRYQSCRQFLYGGCEGNANNFYTWEACDDACWRI	sec. con núm. de ident. 39
	DKI-3.1.1	naeicllpldGgpcraAHlryydyrtqscEqfSyggcegnannfytwecaddacwri	sec. con núm. de ident. 40
30	tfpi-2 DOMINIO 2	VPKVCRLQVS- VDDQCEGSTEKYFFNLSSMTCEKFFSGGCHRRN- IENRFPDEATCMGFCAPK	sec. con núm. de ident. 41
	DKI-3.2.1	vpkvcrlqvs-vddqcRAAHPkyffnlssmtceEffsggchrrn-ienrfpdeatcmgfcapk	sec. con núm. de ident. 42
35	TFPI-2 DOMINIO 3	IPSFYCYSKDEGLCSANVTRYFNPRTCDAFYTYGCGGNDNNFVSREDCKRACAKA	sec. con núm. de ident. 43
	DKI-3.3.1	ipsfcyspkdegHcRaAHQryfnpnryrtcdafytygcggnndnnfvsredckracaka	sec. con núm. de ident. 44
	ITI-K1 HUMANO	KEDSCQLGYSAGPCMGMTSRYFYNGTSMACETFQYGGCMGNGNMFVTEKECLQTCRTV	sec. con núm. de ident. 45
	DKI-4.1.1	kedscqlgyDagpcRgAHPPrfyngtsmacetfSyggcGgnngnfvtekeclqtrtv	sec. con núm. de ident. 46
40	ITI-K2 HUMANO	TVAACNLPIVRGPCRAFIQLWAFDAVKGKCVLPYGGCQGNNGKIFYSEKECREYCGVP	sec. con núm. de ident. 47
	DKI-4.2.1	tvaacnlpiDDgpcraAHqRwafdavkgkcEEfSyggcEgnngkfysekecreycgvp	sec. con núm. de ident. 48
	DKI-4.2.2	tvaacnlpiDDgpcraAHqRwafdavkgkcEEfSyggcgnngkfysekecreycgvp	sec. con núm. de ident. 49
45	PROTEASA HUMANA: NEXINA-II	VREVCSEQAETGPCRAMISRWYFDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNFDTEEYCMVCGSA	sec. con núm. de ident. 50
	DKI-5.1	vrevcseqaetgpcraAHPPrwyfdvtegkceEfSyggcgnrnfdteeycmavcgsa	sec. con núm. de ident. 51
	Dominio HKI B9	LPNVCAFPMKGPQTYMTRWFFNFETGECELFAYGGCGGNSNNFLRKEKCEKFCFKFT	sec. con núm. de ident. 53
	DKI-6.1	lpnvcafpmEdgpcRAAHPPrwffnfetgeceEfayggcggnsnflrkekcekfckft	sec. con núm. de ident. 54
50	DKI-7.1	rpdfcleppEtgpcRaAHPPrfyfnakaglcEEfyggcGakrnrfksaedcmrtcgga	sec. con núm. de ident. 55

55

La Tabla 3 está anteriormente.

TABLA 8: Datos de Unión para la exposición de fagos seleccionada que se une a Calicreína.

Fagos de exposición(a)	Fracción Unida (b)	Unión Relativa (c)
LACI	4×10^{-6}	1.0
BPTI	2×10^{-5}	6.0
KKI/3(a)	$3,649 \times 10^{-3}$	761
KKI/3(b)	2×10^{-3}	524
KKII/3#5	$3,649 \times 10^{-3}$	928
KKII/3#6	8×10^{-3}	2071

(a) Aislamientos clonales de fagos de exposición. LACI-K1 es la molécula parental, BPTI (inhibidor de la tripsina pancreática bovina) es un control y KKI/3 (5 y 6) y KKI/3(a y b) fueron seleccionados por su unión a la proteasa diana, calicreína.
 (b) El número de ufp eluidas después de un experimento de unión como una fracción del número de entrada (10^{10} ufp).
 (c) Fracción unida relativa al fagos de exposición parental, LACI-K1.

Tabla 9: Sustituciones Conservativas y Semiconservativas

Tipo AA inicial	Categoría	Sustitución conservativa	Sustitución semi-conservativa
a	Pequeño no polar o ligeramente polar	G, S, T	N, V, P, (C)
C	SH libre	A, M, L, V, I	F, G
	disulfuro	nada	nada
D	ácido, hidrofílico	E, N, S, T, Q	K, R, H, A
E	ácido, hidrofílico	D, Q, S, T, N	K, R, H, A
F	aromático	W, Y, H, L, M	I, V, (C)
G	conformación de solo Gly	nada	nada
	conformación "normal"	A, S, N, T	D, E, H, I, K, L, M, Q, R, V
H	anfotérico aromático	Y, F, K, R	L, M, A, (C)
I	alifático, ramificado carbono β	V, L, M, A	F, Y, W, G (C)
K	básico	R, H	Q, N, S, T, D, E, A
L	alifático	M, I, V, A	F, Y, W, H, (C)
M	hidrofóbico	L, I, V, A	Q, F, Y, W, (C), (R), (K), (E)
N	no-polar hidrofílico	S, T, (D), Q, A, G, (E)	K, R
P	inflexible	V, I	A, (C), (D), (E), F, H, (K), L, M, N, Q, (R), S, T, W, Y
Q	alifático más amida	N, E, A, S, T, D	M, L, K, R
R	básico	K, Q, H	S, T, E, D, A,

ES 2 514 615 T3

S	hidrófilo	A, T, G, N	D, E, R, K
T	hidrófilo	A, S, G, N, V	D, E, R, K, I
V	alifático, ramificado carbono β	I, L, M, A, T	P, (C)
W	aromático	F, Y, H	L, M, I, V, (C)
Y	aromático	F, W, H	L, M, I, V, (C)

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

Cambiando de M a E, R, K es semiconservativo si la punta iónica del nuevo grupo lateral puede llegar a la superficie de la proteína, mientras que los grupos metileno hacen contactos hidrofóbicos.

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

Tabla 14: Definición de un dominio de Kunitz (sec. con núm. de ident. 52)					
1	2	3	4	5	
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678					
xxxxCxxxxxxGxCxxxxxxXXXxxxxxxCxxFXXGCXxxXxXxxxxxCxxxCxxx					
<i>donde:</i>					
<i>X1, X2, X3, X4, X58, X57, y X56 pueden estar ausentes,</i>					
X21 = Phe, Tyr, Trp,					
X22 = Tyr o Phe,					
X23 = Tyr o Phe,					
X35 = Tyr o Trp,					
X36 = Gly o Ser,					
X40 = Gly o Ala,					
X43 = Asn o Gly, y					
X45 = Phe o Tyr					

ES 2 514 615 T3

Tabla 15: Sustitución para conferir alta afinidad para pKA en KuDoms				
Posición	Preferido	Permitido	Improbable que funcione	
10	<u>Asp</u> , Glu	Ala, Gly, Ser, Thr	Lys, Asn, (Arg, Cys, Phe, His, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, Val, Trp, Tyr)	
5	11	<u>Asp</u> , <u>Gly</u> , Ser, Val	Glu, Leu, Met, [Asn, Ile, Ala, Thr]	(Cys, Phe, His, Lys, Pro, Gln, Arg, Trp, Tyr)
10	12	<u>Gly</u>	(Otros aminoácidos SÓLO si el disulfuro C ₁₄ -C ₃₈ se reemplaza con otros aminoácidos)	
15	13	<u>Arg</u> , <u>His</u> , Pro, Asn, Ser	[Thr, Ala, Gly, Lys, Gln]	Phe, Tyr, Cys, Leu, Ile, Val, Asp (Glu, Met, Trp)
20	14	<u>Cys</u>	(Otros aminoácidos SÓLO si C ₃₈ también cambió.)	
25	15	<u>Arg</u> , Lys	[Ala, Ser, Gly, Met, Asn, Gln]	(Cys, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Leu, Pro, Thr, Val, Trp, Tyr)
30	16	<u>Ala</u> , <u>Gly</u>	[Ser, Asp, Asn]	(Cys, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr)
35	17	<u>Ala</u> , <u>Asn</u> , Ser, Ile	[Gly, Val, Gln, Thr]	Cys, Asp, Phe, His, Pro, Arg, Tyr, (Glu, Lys, Met, Trp)
40	18	<u>His</u> , Leu, Gln	[Ala,	Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr)
45	19	<u>Pro</u> , <u>Gln</u> , <u>Leu</u>	[Asn, Ile]	Ala, Glu, Gly, Met, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, (Cys, Asp, Phe, His, Tyr)
50	20	<u>Arg</u>	Leu, Ala, Ser, Lys, Gln, Val	(Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Met, Asn, Pro, Thr, Trp, Tyr)
55	21	<u>Trp</u> , <u>Phe</u>	[Tyr, His, Ile]	Cys, Leu (Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val)
	31	<u>Glu</u>	[Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Thr]	(Arg, Lys, Cys, Phe, Gly, His, Met, Pro, Trp, Tyr)
	32	<u>Glu</u> , <u>Gln</u>	[Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly, Val]	(Cys, Phe, His, Ile, Lys, Met, Arg, Trp, Tyr)
	33	<u>Phe</u>	[Tyr]	otro 18 excluido
	34	<u>Ser</u> , <u>Thr</u> , <u>Ile</u>	[Val, Ala, Asn, Gly, Leu]	Cys, Asp, Glu, Phe, His, Lys, Met, Pro, Gln, Arg, Trp, Tyr
	35	<u>Tyr</u>	[Trp, Phe]	(otro 17)
	36	<u>Gly</u>	Ser, Ala	(otro 17)
	37	<u>Gly</u>	(Otros tipos de aminoácidos permitidos solo si C ₁₄ -C ₃₈ se reemplaza con otros tipos.)	
	38	<u>Cys</u>	(Otros aminoácidos SÓLO si C ₁₄ cambió también)	
	39	<u>Gly</u> , <u>Glu</u> , <u>Ala</u>	[Ser, Asp]	Otro 15.

Bajo "Preferido", se subraya el tipo más altamente preferido
 Bajo "Permitido" están los tipos no probados actuamente, pero que se juzgan como aceptables. Tipos mostrados entre corchetes se permiten pero no se seleccionaron, pero son similares a los tipos que se seleccionaron del tipo que es improbable que elimine la unión a pKA. Tales tipos no son preferidos, pero las proteínas de unión a pKA pueden tener esos tipos.
 Bajo "Improbable que funcione", los tipos que se muestran fuera de paréntesis, han sido juzgados y no se tienen aislamientos de ese tipo; los tipos en paréntesis no se probaron, pero se juzgan como inadecuados a partir de la consideración de los tipos actualmente excluidos

ES 2 514 615 T3

TABLA 21: Primera variegación de LACI-K1

5	a	b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	A	E	M	H	S	F	C	A	F	K	A	D
	gcc gag atg cat tcc ttc tgc gcc ttc aag gct gat											
				<u> NsiI </u>								
10							I N					
							C H					
							F S F Y					
15							Y C L S L S					
							L P W P W P					
							H R Q R Q R					
							<u>I T M T M T</u>					
20							N V K V <u>K V</u>					
	L P						A D A E A E					
	D	G	H R	C	K	<u>A G</u>	G	D G	G	R		
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
25	gat ggt cNT tgt aaa gSt NNT NNS NNG cgt											
	F	F	F	N	I	F	T	R	Q	C		
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
30	ttc ttc ttc aac atc ttc acg cgt cag tgc											
							<u> MluI </u>					
35							Q E		N H			
							M K		C I			
							F S		F Y			
							Y C		L S			
40							L P		W P			
							H R		Q R			
							<u>I T</u>		M T			
45							N V		K V			
							A D		<u>A E</u>			
	E Q	E Q	F	G W	Y	G	G	C	G D	G	N	Q
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
50	Sag Saa ttc NNS tac ggt ggt tgt NNS ggt aac cag											
									<u> BstEII </u>			
55												

Tabla 21, continuación

5
 N R F E S L E E
 43 44 45 46 47 48 49 50
 |aac|cgg|ttc|gaa|tct|cta|gag|gaa|
 | BstBI | | XbaI |
 | AgeI |

10
 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
 C K K M C T R D G A
 |tgt|aag|aag|atg|tgc|act|cgt|gac|ggc gcc
 | KasI |

15

20 El segmento a partir de *Nsi* a *Mlu* da 65,536 secuencias de ADN y 31,200 secuencias de proteínas. El segundo grupo de variegación da 21,840 y 32,768 variantes. Esta variegación puede entrar en un fragmento que tiene *Mlu* y uno de los extremos *Age*I, *Bst*BI, o *Xba*I. Debido a la cercanía entre el codón 42 y el sitio de restricción 3', uno hará un oligonucleótido de cebado automático, rellenará, y cortará con *Mlu* y, por ejemplo, *Bst*BI. Las variantes totales son 2.726×10^9 y 8.59×10^9 . La secuencia de ADN tiene la sec. con núm. de ident. 56. La secuencia de aminoácido tiene la sec. con núm. de ident. 57.

25

TABLA 23: Resultados de Especificidad

La proteína que aparece en M13 gIIIp	Enzima inmovilizada probada				
	Plasmina	Trombina	PKA	Tripsina	Tripsina, 2 lavados
LACI-K1	1	1	1	1	1
KkII/3 (D)	3.4	1.5	196.	2.	1.4
BPTI	88.	1.1	1.7	0.3	.8

30

35 Los números se refieren a la relación de unión de los clones de fagos de exposición en comparación con el fagos de exposición parental. El clon KkII/3(D) (calicreína) conserva la afinidad de la molécula parental para tripsina. KkII/3(D) fue seleccionado para unirse a pKA.

40

45

50

55

Tabla 24: Vectores de expresión Mat α de *S. cerevisiae*:

Mat α 1 (Mf α 8)

5' - ... | AAA | AGG | CCT | CGA | G... -3' sec. con núm. de ident. 58
| StuI | sec. con núm. de ident. 59
| XhoI |

Mata2 (después de introducción de un enlazador en ADN cortado con *StuI*)

aminoácidos sec. con núm. de ident. 60
 K R E A A E P W G A . . L E
 5' | AAA | AGG | GAA | GCG | GCC | GAG | CCA | TGG | GGC | GCC | TAA | TAG | CTC | GAG | 3'
| EagI | | StyI | KasI | | XhoI |

ADN sec. con núm. de ident. 61

Mata-LACI-K1, aminoácidos: sec. con núm. de ident. 62, DNA: sec. con núm. de ident. 63

K R a b c d l 2 3 4 5 6 7 8
 5' | AAA | AGG | GAA | GCG | GCC | GAG | atg | cat | tcc | ttc | tgc | gct | ttc | aaa |
| EagI | | NsiI |

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

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

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

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

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

Se esperamos que esa secuencia pre Mata sea escindida antes de GLU_a-ALA_b-

Tabla 27: inhibidores de alta especificidad de Calicreína de plasma

5	LACI-K1 (sec. con núm. de ident. 3)
	MHSFCAFKADDGPCKAIMKRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFSLEECKKMCTRD
	KKII/3#7 (sec. con núm. de ident. 11)
	mhsfcfkaddgHck ANHQR fffniftrqc EEf SyggcGgnqnrfsleeeckmctrd
10	KKII/3#7-K15A (sec. con. núm. de ident. 64)
	mhsfcfkaddghc A anhqrrfffniftrqceefsyggcgggnqnrfsleeeckmctrd
	KK2/#13-R15A (sec. con núm. de ident. 65)
15	mhsfcfkaDGgRc AGA HP r Wffniftrqc EEf SyggcGgnqnrfsleeeckmctrd
	KK2/#11-R15S (sec. con núm. de ident. 66)
	mhsfcfkaddgpc S aahprwffniftrqceefsyggcgggnqnrfsieeeckmctrd

Tabla 49

	Número del residuo																			
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21								
25	LACI-K1	D	D	G	P	C	K	a	I	M	K	R	F							
	Consenso de KKII/3 seleccionados	D	D	G	H	C	K	a	N	H	Q	R	F							
30	KK genoteca #2	NK DE	NI ST	AD GV	G	FS NV	YC AD	LP G	HR IT	IT	C	KR	AG	NI ST	AD GV	QL HP	R	QL HP	R	FW CL
	KK2/#13	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
	KK2/#14	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
35	KK2/#5	-	-	-	P	-	-	a	-	-	-	-	-							
	KK2/#11	-	-	-	P	-	-	a	-	-	-	-	-							
	KK2/#1	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
40	KK2/#4	-	V	-	-	-	-	-	-	Q	-	-	F							
	KK2/#6	-	-	-	S	-	-	a	-	-	L	-	-							
45	KK2/#10	E	G	-	S	-	-	a	-	-	Q	-	-							
	KK2/#8	-	-	-	P	-	-	-	-	-	L	-	F							
	KK2/#3	-	-	-	H	-	-	-	-	L	-	-	-							
	KK2/#9	-	S	-	N	-	-	-	N	L	-	-	F							
50	KK2/#7	-	S	-	-	-	-	-	N	-	Q	-	F							
	KK2/#12	-	G	-	-	-	-	a	I	Q	-	-	-							
55	Consenso #2	D	D	G	R	C	R	G	a	H	P	R	W							

Tabla 750: ADN que incorpora genoteca KKF.

```

5
      M   H   S   F   C   A   F   K   A   N|K
      1   2   3   4   5   6   7   8   9   D|E
5'-cctcct atg cat tcc ttc tgc gcc ttc aag gct Ras
      | NsiI |

10
      F|S
      Y|C
      L|H
      R|I

15
      I|V   V|T           V|T (M) (K)
      T|A   A|G           A|S L|P L|P
      S|G   D|N           G|D Q|R R|H
      D|N G   P   C   K|R A|G I|N H   Q   R
      11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
20
      RNT ggt NNT tgt aRa gSt RNT cNS cNS cgt

      W|L
      F|C F   F   N   I   F   T   R (SEQ ID NO. 69)
      21 22 23 24 25 26 27 28
25
      tKS ttc ttc aac atc ttc acg cgt tccctcc-3' (SEQ ID NO. 67)
      3'-g ttg tag aag tgc gca agggagg-5' (SEQ ID NO. 68)
      | MluI |
  
```

30 Los sitios *RsrII* y *BspHI* encontrados en el gen parental LACI-K1 mostrado (Tabla 6) no están presentes en la genoteca KKF. Hay 1,536,000 secuencias de aminoácidos y 4,194,304 secuencias de ADN. Met₁₈ y Lys₁₉ no se permiten en la genoteca KKF.

Citas:

35 ADEL86: Adelman y otros, Blood (1986) 68(6)1280-1284.
 ALBR83a: Albrecht y otros, Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem (1983), 364:1697-1702.
 ALBR83b: Albrecht y otros, Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem (1983), 364:1703-1708.
 40 ANBA88: Anba y otros, Biochimie (1988) 70(6)727 -733.
 ANGL87: Angliker y otros, Biochem J (1987) 241(3)871-5.
 AUER88: Auerswald y otros, Bio Chem Hoppe-Seyler (1988), 369(Supplement):27-35.
 BALD85: Balduyck y otros, Biol Chem Hoppe-Seyler (1985) 366:9-14.
 BANE90: Baneyx & Georgiou, J Bacteriol (1990) 172(1)491-494.
 BANE91: Baneyx & Georgiou, JBacteriol (1991) 173(8)2696-2703.
 45 BERN93: Berndt y otros, Biochemistry (1993) 32:4564-70.
 BHOO92: Bhoola y otros, Pharmacological Reviews (1992) 44(1)1-80.
 BROW91: Browne y otros, GeneBank entrada M74220.
 BROZ90: Broze y otros, Biochemistry (1990) 29:7539-7546.
 COLM87: Colman y otros, Editors, Hemostasis and Thrombosis, Segunda Edición, 1987, J. B. Lippincott Company, Filadelfia, PA.
 50 COLM87a: Colman y otros, Capítulo 1 de COLM87.
 DAVI79: Davis y otros, Estados Unidos Patente 4,179,337 (1979).
 DENN94a: Dennis & Lazarus, JBiological Chem (1994) 269:22129-22136.
 DENN94b: Dennis & Lazarus, Biological Chem (1994) 269:22137-22144.
 55 EIGE90: Eigenbrot y otros, Protein Engineering (1990), 3(7)591-598.
 ELLI92: Ellis y otros, Ann N Y Acad Sci (1992) 667:13-31.
 FIDL94: Fidler & Ellis, Cell (1994) 79:185-188.
 FRAE89: Fraedrich y otros, Thorac Cardiovasc Surg (1989) 37(2)89-91.

- GARD93: Gardell, Toxicol Pathol (1993) 21(2)190-8.
 GIRA89: Girard y otros, Nature (1989), 338:518-20.
 GIRA91: Girard y otros, J. BIOL. Chem. (1991) 266:5036-5041.
 5 HOOV93: Hoover y otros, Biochemistry (1993) 32:10936-43.
 HORT91: Hortin & Trimpe, J Biol Chem (1991) 266(11)6866-71.
 HYNE90: Hynes y otros, Biochemistry (1990), 29:10018-10022.
 KEMP88b: Kemp & Bowen, Tetrahedron Letts (1988) 29:5077-5080.
 KIDO88: Kido y otros, J Biol Chem (1988), 263:18104-7,
 10 KIDO90: Kido y otros, Biochem & Biophys Res Comm (1990), 167(2)716-21.
 KLIN91: Kline y otros, Biochem Biophys Res Commun (1991) 177(3)1049-55.
 LASK80: Laskowski & Kato, Ann Rev Biochem (1980), 49:593-626.
 LEAT91: Leatherbarrow & Salacinski, Biochemistry (1991) 30(44)10717-21.
 LOHM93: Lohmann & J Marshall, Refract Corneal Surg (1993) 9(4)300-2.
 LUCA83: Lucas y otros, J Biological Chem (1983) 258(7)4249-56.
 15 MANN87: Mann & Foster, Capítulo 10 de COLM87.
 MARC85: Advanced Organic Chemistry, Third Edition March, J, John Wiley and Sons, Nueva York, 1985; ISBN 0-471-88841-9.
 MIYA85: Miyajima y otros, Gene (1985) 37:155-161.
 NEUH89: Neuhaus y otros, Lancet (1989) 2(8668)924-5.
 20 NOVO89: Novotny y otros, J. BIOL. Chem. (1989) 264:18832-18837.
 PARK86: Park & Tulinsky, Biochemistry (1986) 25(14)3977-3982.
 PUTT89: Putterman, Acta Chir Scand (1989) 155(6-7)367.
 ROBB87: Robbins, Capítulo 21 de COLM87
 SCHE67: Schechter & Berger. Biochem Biophys Res Commun (1967) 27:157-162.
 25 SCHE68: Schechter & Berger. Biochem Biophys Res Commun (1968) 32:898-902.
 SCHM87: Schmaier y otros, Capítulo 2 en COLM87.
 SCHN86: Schnabel y otros, Biol Chem Hoppe-Seyler (1986), 367:1167-76.
 SHER89: Sheridan y otros, Dis Colon Rectum (1989) 32(6)505-8.
 TIAN92: Tian y otros, Int J Pept Protein Res (1992) 40(2)119-26.
 30 VAND91: van der Logt y otros, BIOCHEMISTRY (1991) 30:1571-1577.
 VAND92: van Dijk y otros, EMBO J (1992) 11(8)2819-2828.
 VARA83: Varadi & Patthy, Biochemistry (1983) 22:2440-2446.
 VARA84: Varadi & Patthy, Biochemistry (1984) 23:2108-2112.
 WILS93: Wilson y otros, Tetrahedron (1993)49(17)3655-63.
 35 WUNT88: Wun y otros, J. BIOL. Chem. (1988) 263:6001-6004

A continuación se describen ejemplos preferidos de la presente descripción y se conocen como E₁ a E₁₆.

- 40 E1. Una proteína inhibidora de calicreína que comprende un dominio de Kunitz con los residuos numerados por referencia al inhibidor de la tripsina pancreática bovina maduro, en donde, en cada uno de los residuos correspondientes a los residuos identificados de BPT1 a continuación, uno de los siguientes aminoácidos permitidos se encuentra,

- 10Asp, Glu
 11Asp, Gly, Ser, Val
 45 13His, Pro, Arg, Asn, Ser
 15Arg, Lys
 16Gly, Ala
 17Asn, Ser, Ala, Ile
 18His, Leu, Gin
 50 19Gln, Leu, Pro
 21Trp, Phe
 31Glu
 32Glu, Gln
 34Ser, Thr, Ile
 55 39Gly, Glu, Ala.

E2. Una proteína inhibidora de la calicreína plasmática que comprende una secuencia que es sustancialmente homóloga a una secuencia de referencia se selecciona a partir del grupo que consiste en

KKII/3 # 1, KKII/3 # 2, KKII/3 # 3, KKII/3 # 4, KKII/3 # 5, KKII/3 # 6, KKII/3 # 7, KKII/3 # 8, KKII/3 # 9, KKII/3 # 10, KK2/#11, KK2/#13, KK2/#1, KK2/#2, KK2/#3, KK2/#4, KK2/#6, KK2/#7, KK2/#8, KK2/#9, KK2/#10, KK2/#12, y KK2con1 como se define en la Tabla 2.

5

E3. Un método para prevenir o tratar un trastorno atribuible a excesiva actividad de calicreína que comprende administrar, a un sujeto humano o animal que se beneficiaría de la misma, una cantidad de la proteína inhibidora de calicreína o análogo de E1 o E2.

10

E4. Un método de ensayo para la calicreína que comprende proporcionar la proteína pr análoga de E1 o E2 en forma marcada o insoluble, y determinar si se forma un complejo de dicha proteína y la calicreína en una muestra.

15

E5. Un método de purificación de calicreína a partir de una mezcla que comprende proporcionar el análogo de proteína de E1 en forma insolubilizada, y poner en contacto la mezcla con dicha proteína insolubilizada o análogo de forma que la calicreína en la mezcla se una.

20

Lys-Glu-Asn-Ser-Cys-Gln-Lys-Gln-Tyr-Xaa10-Ala-Gly-Pro-Cys-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Arg-Xaa21-Phe-Tyr-Asn-Glu-Thr-Ser-Met-Ala-Cys-Glu-Thr-Phe-Xaa34-Tyr-Gly-Gly-Cys-Xaa39-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Phe-Glu-Lys-Glu-Cys-Leu-Gln-Thr-Cys-Arg-Thr-Val,

25

en donde:

30

Xaa10 se selecciona a partir de Asp, Glu, Ala, Gly, Ser, y Thr;
 Xaa15 se selecciona a partir de Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn y Gin;
 Xaa16 se selecciona a partir de Ala, Gly, Ser, Asp, y Asn;
 Xaa17 se selecciona a partir de Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln y Thr;
 Xaa18 se selecciona a partir de His, Leu, Gln, y Ala;
 Xaa19 se selecciona a partir de Pro, Gln, Leu, Asn, Ile;
 Xaa21 se selecciona a partir de Trp, Phe, Tyr, His y Ile;
 Xaa34 se selecciona a partir de Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly y Leu; y
 Xaa39 se selecciona a partir de Gly, Glu, Ala, Ser y Asp,
 y en donde el polipéptido inhiba la calicreína.

40

E7. El polipéptido de E6 que se une calicreína, que comprende la secuencia de aminoácidos y en donde:

45

Xaa10 se selecciona a partir de Asp, y Glu;
 Xaa15 se selecciona a partir de Arg, y Lys;
 Xaa16 se selecciona a partir de Ala, y Gly;
 Xaa17 se selecciona a partir de Ala, Asn, Ser, y Ile;
 Xaa18 se selecciona a partir de His, Leu, y Gln;
 Xaa19 se selecciona a partir de Pro, Gln, y Leu;
 Xaa21 se selecciona a partir de Trp, y Phe;
 Xaa34 se selecciona a partir de Thr, Ile, y Ser,
 Xaa39 se selecciona a partir de Gly, Glu, y Ala.

50

E8. El polipéptido de E6 que se une a calicreína, que comprende la secuencia de aminoácidos y en donde:

55

Xaa10 es Asp;
 Xaa15 es Arg;
 Xaa17 se selecciona a partir de Ala, y Asn; y

Xaa18.

E9. El polipéptido de E6 que se une a calicreína, que comprende la secuencia de aminoácidos y en donde:

- 5 Xaa10 es Asp;
 Xaa15 es Arg;
 Xaa16 es Ala;
 Xaa17 se selecciona a partir de Ala y Asn;
 10 Xaa18 es His;
 Xaa19 es Gln; y
 Xaa21 es Trp.

E10. El polipéptido de E8 or E9 que se une a calicreína, que comprende la secuencia de aminoácidos y en donde:

- 15 Xaa34 es Ser; y
 Xaa39 es Gly.

E11. Uso de un polipéptido según cualquiera de E6 a E10 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o profilaxis de la hipotensión, la inflamación, shock vascular, edema asociado con bacteremia o trauma, edema y la hiperreactividad de las vías respiratorias del asma, dolor inflamatorio y neurogénico asociado con lesión de los tejidos, angioedema hereditario y sangrado excesivo.

E12. Un método para ensayar la presencia de calicreína que comprende: adición de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de E6 a E10 a una muestra de interés, y determinar si se forma un complejo de dicho polipéptido y la calicreína.

E13. Un método de purificación de calicreína átomo de una mezcla que comprende: contactar la mezcla con un polipéptido de acuerdo con cualquiera de E6 a E10, y separar polipéptido unido a la calicreína de los otros componentes de la mezcla.

E14. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de E6 a E10 para el uso en el tratamiento o profilaxis de un trastorno caracterizado por actividad excesiva de la calicreína.

E15. Un polipéptido según cualquiera de E6 a E10 para uso en el tratamiento o profilaxis de la hipotensión, la inflamación, shock vascular, edema asociado con bacteremia o trauma, edema y la hiperreactividad de las vías respiratorias del asma, dolor inflamatorio y neurogénico asociado con lesión de los tejidos, angioedema hereditario y sangrado excesivo.

E16. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de cualquiera de E6 a E10 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Dyax Corporation

<120> PROTEÍNAS DE UNIÓN A CALICREÍNA DE "DOMINIO KUNITZ" Y ANÁLOGOS DE ELLA

45 <130> D39076PCEPT2

<140> EP 08 018 863.4

<141> 1995-01-11

50 <150> Estados Unidos 179,964

<151> 1994-01-11

<150> Estados Unidos 208,264

<151> 1994-03-10

55 <160> 69

<170> FastSEQ para windows versión 4.0

ES 2 514 615 T3

5 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

10

<210> 5
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20 <400> 5

25 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

30

<210> 6
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

35 <400> 6

40 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

50

<210> 7
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

55

ES 2 514 615 T3

<400> 7

5 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50

<210> 8

<211> 58

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

20 <400> 8

25 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Gln
 20 Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50

<210> 9

<211> 58

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 9

40 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 Ser Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50

<210> 10

<211> 58

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 10

ES 2 514 615 T3

5 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

10

<210> 11
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20 <400> 11

25 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

30

<210> 12
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido generado sintéticamente

40 <400> 12

45 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

50

<210> 13
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido generado sintéticamente

55

ES 2 514 615 T3

<400> 13

5 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 10 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

<210> 14

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido generado sintéticamente

20

<400> 14

25 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly
 1 5 10
 Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ile Tyr Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 30 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

35

<210> 15

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

40

<400> 15

45 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Lys Gly
 1 5 10
 Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 50 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

55

<210> 16

<211> 58

ES 2 514 615 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido generado sintéticamente

5

<400> 16

```

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala
 1      5      10      15
Ile His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20      25      30
Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35      40      45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50      55
    
```

10

15

<210> 17
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20

25

<400> 17

```

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1      5      10      15
Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20      25      30
Phe ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35      40      45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50      55
    
```

30

35

<210> 18
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 18

45

50

55

ES 2 514 615 T3

5 Met Ile Tyr Thr Met Lys Lys Val His Ala Leu Trp Ala Ser Val Cys
 1 Leu Leu Leu Asn Leu Ala Pro Ala Pro Leu Asn Ala Asp Ser Glu Glu
 20 Thr Ile Ile Thr Thr Glu Leu Pro Pro Leu Lys
 35 His Thr Ile Thr Thr Glu Leu Pro Pro Leu Lys
 40 Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys
 50 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu
 65 Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu
 70 Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser
 85 Tyr Gly Cys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala Asn Arg Ile
 100 Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala Asn Arg Ile
 115 Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu
 125 Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu
 130 Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn
 145 Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly
 155 Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu
 165 Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly Thr Gln Leu Asn
 180 Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val Pro Ser Leu
 195 Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly
 210 Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly
 225 Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn
 235 Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly Phe Ile
 245 Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys
 255 Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe Val Lys Asn Met
 290 295 300

35 <210> 19
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

40 <400> 19

45 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Gly
 1 Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50

55 <210> 20
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

ES 2 514 615 T3

<400> 20

5 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Gly
 1 5 10
 Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

10

<210> 21

<211> 58

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 21

20

25 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala
 1 5 10
 Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

30

<210> 22

<211> 58

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 22

40

45 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala
 1 5 10
 Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

50

<210> 23

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 23

ES 2 514 615 T3

5 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

10 <210> 24
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 24

20 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

30 <210> 25
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 35 <400> 25

40 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Ser Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Leu Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

50 <210> 26
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 55 <400> 26

ES 2 514 615 T3

5 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Gly Gly Ser Cys Arg Ala
 1 1 5 10 15
 Ala His Gln Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

10 <210> 27
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 27

20 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

30 <210> 28
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 28

40 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala Leu Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

45 <210> 29
 <211> 58
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 55 <400> 29

ES 2 514 615 T3

5
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Asn Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Asn Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

10

<210> 30
 <211> 58
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20

25
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Arg Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

30

<210> 31
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

40

45
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ile Gln Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

50

<210> 32
 <211> 58
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

ES 2 514 615 T3

<400> 32

5 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

<210> 33

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

20 Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg
 20 25 30
 Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu Asp Gly
 50 55

<210> 34

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 34

40 Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Gly Gly Arg Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala His Pro Arg Trp Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu Asp Gly
 50 55

<210> 35

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

55

ES 2 514 615 T3

5 Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro
 20 25 30
 Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys
 35 40 45
 Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly
 50 55

10 <210> 36
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 36

20 Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Pro Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly Lys Cys Glu Pro
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys
 35 40 45
 Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly
 50 55

30 <210> 37
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 37

40 Glu Thr Asp Ile Cys Lys Leu Pro Lys Asp Glu Gly Arg Cys Arg Asp
 1 5 10 15
 Phe Ile Leu Lys Trp Tyr Tyr Asp Pro Asn Thr Lys Ser Cys Ala Arg
 20 25 30
 Phe Trp Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Lys Phe Gly Ser Gln
 35 40 45
 Lys Glu Cys Glu Lys Val Cys Ala Pro Val
 50 55

45 <210> 38
 <211> 58
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 55 <400> 38

ES 2 514 615 T3

5
 Glu Thr Asp Ile Cys Lys Leu Pro Lys Asp Glu Gly Thr Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Leu Lys Trp Tyr Tyr Asp Pro Asn Thr Lys Ser Cys Ala Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Lys Phe Gly Ser Gln
 35 40 45
 Lys Glu Cys Glu Lys Val Cys Ala Pro Val
 50 55

10 <210> 39
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 39

20
 Asn Ala Glu Ile Cys Leu Leu Pro Leu Asp Tyr Gly Pro Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Arg Tyr Tyr Tyr Asp Arg Tyr Thr Gln Ser Cys Arg Gln
 20 25 30
 Phe Leu Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Ala Asn Asn Phe Tyr Thr Trp
 35 40 45
 Glu Ala Cys Asp Asp Ala Cys Trp Arg Ile
 50 55

25
 <210> 40
 <211> 58
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

35 <400> 40

40
 Asn Ala Glu Ile Cys Leu Leu Pro Leu Asp Gly Gly Pro Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Leu Arg Tyr Tyr Tyr Asp Arg Tyr Thr Gln Ser Cys Glu Gln
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Ala Asn Asn Phe Tyr Thr Trp
 35 40 45
 Glu Ala Cys Asp Asp Ala Cys Trp Arg Ile
 50 55

45
 <210> 41
 <211> 61
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 41

55

5 Val Pro Lys Val Cys Arg Leu Gln Val Ser Val Asp Asp Gln Cys Glu
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Asn Leu Ser Ser Met Thr Cys Glu
 20 25 30
 Lys Phe Phe Ser Gly Gly Cys His Arg Asn Arg Ile Glu Asn Arg Phe
 35 40 45
 Pro Asp Glu Ala Thr Cys Met Gly Phe Cys Ala Pro Lys
 50 55 60

10
 <210> 42
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 42

20 Val Pro Lys Val Cys Arg Leu Gln Val Ser Val Asp Asp Gln Cys Arg
 1 5 10 15
 Ala Ala His Pro Lys Tyr Phe Phe Asn Leu Ser Ser Met Thr Cys Glu
 20 25 30
 Glu Phe Phe Ser Gly Gly Cys His Arg Asn Arg Ile Glu Asn Arg Phe
 35 40 45
 Pro Asp Glu Ala Thr Cys Met Gly Phe Cys Ala Pro Lys
 50 55 60

30
 <210> 43
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 43

40 Ile Pro Ser Phe Cys Tyr Ser Pro Lys Asp Glu Gly Leu Cys Ser Ala
 1 5 10 15
 Asn Val Thr Arg Tyr Tyr Phe Asn Pro Arg Tyr Arg Thr Cys Asp Ala
 20 25 30
 Phe Thr Tyr Thr Gly Cys Gly Gly Asn Asp Asn Asn Phe Val Ser Arg
 35 40 45
 Glu Asp Cys Lys Arg Ala Cys Ala Lys Ala
 50 55

45
 <210> 44
 <211> 58
 <212> PRT
 50
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 55
 <400> 44

ES 2 514 615 T3

5 Ile Pro Ser Phe Cys Tyr Ser Pro Lys Asp Glu Gly His Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Gln Arg Tyr Tyr Phe Asn Pro Arg Tyr Arg Thr Cys Asp Ala
 20 25 30
 Phe Thr Tyr Thr Gly Cys Gly Gly Asn Asp Asn Asn Phe Val Ser Arg
 35 40 45
 Glu Asp Cys Lys Arg Ala Cys Ala Lys Ala
 50 55

10 <210> 45
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 45

15 Lys Glu Asp Ser Cys Gln Leu Gly Tyr Ser Ala Gly Pro Cys Met Gly
 1 5 10 15
 Met Thr Ser Arg Tyr Phe Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Cys Glu Thr
 20 25 30
 Phe Gln Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr Glu
 35 40 45
 Lys Glu Cys Leu Gln Thr Cys Arg Thr Val
 50 55

25 <210> 46
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 46

35 Lys Glu Asp Ser Cys Gln Leu Gly Tyr Asp Ala Gly Pro Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala His Pro Arg Tyr Phe Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Cys Glu Thr
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr Glu
 35 40 45
 Lys Glu Cys Leu Gln Thr Cys Arg Thr Val
 50 55

45 <210> 47
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 47

55

ES 2 514 615 T3

5
 Thr Val Ala Ala Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Phe Ile Gln Leu Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu
 20 25 30
 Phe Pro Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu
 35 40 45
 Lys Glu Cys Arg Glu Tyr Cys Gly Val Pro
 50 55

10
 <210> 48
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 48

20
 Thr Val Ala Ala Cys Asn Leu Pro Ile Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Gln Leu Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu
 35 40 45
 Lys Glu Cys Arg Glu Tyr Cys Gly Val Pro
 50 55

30
 <210> 49
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 35
 <400> 49

40
 Thr Val Ala Ala Cys Asn Leu Pro Ile Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Gln Arg Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu
 35 40 45
 Lys Glu Cys Arg Glu Tyr Cys Gly Val Pro
 50 55

45
 <210> 50
 <211> 58
 <212> PRT
 50
 <213> Homo sapiens
 <400> 50

55

ES 2 514 615 T3

5 Val Arg Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Met Ile Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro
 20 25 30
 Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu
 35 40 45
 Glu Tyr Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala
 50 55

10 <210> 51
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 51

20 Val Arg Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu
 35 40 45
 Glu Tyr Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala
 50 55

30 <210> 52
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar=""
 <220>
 40 <223> Xaa = ausente o cualquier aminoácido; No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> /reemplazar=""
 45 <220>
 <223> Xaa = ausente o cualquier aminoácido; No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 50 <223> /reemplazar=""
 <220>
 <223> Xaa = ausente o cualquier aminoácido; No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /reemplazar=""
 <220>
 <223> xaa = ausente o cualquier aminoácido; No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 20 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> /reemplazar="Glu" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Gly" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr"
 25 <220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 30 <223> /reemplazar="Gly" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Val" /reemplazar="Glu" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Met"
 /reemplazar="Asn" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Thr"
 <220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 35 <221> VARIANTE
 <222> (13)..(13)
 <223> /reemplazar="His" /reemplazar="Pro" /reemplazar="Asn" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Ala"
 /reemplazar="Gly" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Gln"
 <220>
 40 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 <223> /reemplazar="Lys"/reemplazar="Ala" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Gly" /reemplazar="Met" /reemplazar="Asn" /
 45 reemplazar="Gln"
 <220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 50 <222> (16)..(16)
 <223> /reemplazar="Gly" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Asn"
 <220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 55 <221> VARIANTE
 <222> (17)..(17)
 <223> /reemplazar="Asn" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Ile" /reemplazar="Gly" /reemplazar="Val" /reemplazar="Gln"
 /reemplazar="Thr"

<220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> (18)..(18)
 <223> /reemplazar="Leu" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Ala"
 <220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> (19)..(19)
 <223> /reemplazar="Gln" /reemplazar="Leu" /reemplazar="Asn" /reemplazar="Ile"
 <220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20)..(20)
 <223> /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Lys" /reemplazar="Gln" /reemplazar="Val"
 <220>
 20 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (21)..(21)
 <223> /reemplazar="Phe" /reemplazar="Tyr" /reemplazar="His" /reemplazar="Ile"
 25 <220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (22)..(22)
 30 <223> /reemplazar="Phe"
 <220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (24)..(24)
 40 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 50 <221> VARIANTE
 <222> (27)..(27)
 <223> xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 55 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE

<222> (29)..(29)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> (31)..(31)
 <223> /reemplazar="Asp /reemplazar="Gln" /reemplazar="Asn" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Val"
 /reemplazar="Leu" /reemplazar="Ileu" /reemplazar="Thr"
 <220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (32)..(32)
 <223> /reemplazar="Gln" /reemplazar="Asp" /reemplazar="Asn" /reemplazar="Pro" /reemplazar="Thr" /reemplazar="Leu"
 /reemplazar="Ser" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Gly" /reemplazar="Val"
 15 <220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (33)..(33)
 20 <223> /reemplazar="Tyr"
 <220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 25 <222> (34)..(34)
 <223> /reemplazar="Ile" /reemplazar="Ser" /reemplazar="Val" /reemplazar="Ala" /reemplazar="Asn" /reemplazar="Gly"
 /reemplazar="Leu"
 <220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (35)..(35)
 <223> /reemplazar="Trp" /reemplazar="Phe"
 <220>
 35 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (36)..(36)
 <223> /reemplazar="Ser" /reemplazar="Ala"
 40 <220>
 <223> No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (39)..(39)
 45 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (40)..(40)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (41)..(41)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 55 <221> VARIANTE
 <222> (42)..(42)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (43)..(43)
 <223> xaa = cualquier aminoácido
 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (44)..(44)
 <223> xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> (46)..(46)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (47)..(47)
 20 <223> xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (48)..(48)
 <223> xaa = cualquier aminoácido
 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (49)..(49)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 30 <221> VARIANTE
 <222> (50)..(50)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> (52)..(52)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (53)..(53)
 40 <223> xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (54)..(54)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (56)..(56)
 <223> /reemplazar=""
 <220>
 50 <223> xaa = ausente o cualquier aminoácido; No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (57)..(57)
 <223> /reemplazar=""
 55 <220>
 <223> Xaa = ausente o cualquier aminoácido; No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia
 <220>
 <221> VARIANTE

<222> (58)..(58)

<223> /reemplazar=""

<220>

<223> xaa = ausente o cualquier aminoácido; No se da preferencia al aminoácido que aparece en la secuencia

5 <400> 52

10 Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Asp Gly Arg Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Pro Arg Trp Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Xaa
 35 40 45
 xaa xaa Cys xaa xaa xaa Cys xaa xaa xaa
 50 55

15

<210> 53

<211> 58

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 53

25 Leu Pro Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu Lys Gly Pro Cys Gln Thr
 1 5 10 15
 Tyr Met Thr Arg Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys Glu Leu
 20 25 30
 Phe Ala Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Ser Asn Asn Phe Leu Arg Lys
 35 40 45
 Glu Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe Thr
 50 55

30

<210> 54

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

40 <400> 54

45 Leu Pro Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu Asp Gly Pro Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ala Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Ser Asn Asn Phe Leu Arg Lys
 35 40 45
 Glu Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe Thr
 50 55

50

<210> 55

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

55

<400> 55

5 Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Pro Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Val Tyr Gly Gly Cys Gly Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
 35 40 45
 Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
 50 55

10

<210> 56
 <211> 186
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido generado sintéticamente
 <220>
 20 <221> características_misceláneas
 <222> (44)..(44)
 <223> n = a, t, c o g
 <220>
 <221> características_misceláneas
 25 <222> (55)..(55)
 <223> n = a, t, c o g
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (56)..(56)
 30 <223> n = a, t, c o g
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (58)..(58)
 <223> n = a, t, c o g
 35 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (59)..(59)
 <223> n = a, t, c o g
 <220>
 40 <221> características_misceláneas
 <222> (61)..(61)
 <223> n = a, t, c o g
 <220>
 <221> características_misceláneas
 45 <222> (62)..(62)
 <223> n = a, t, c o g
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (106)..(106)
 50 <223> n = a, t, c o g
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (107)..(107)
 <223> n = a, t, c o g
 55 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (121)..(121)
 <223> n = a, t, c o g

<220>
 <221> características_miscláneas
 <222> (122)..(122)
 <223> n = a, t, c o g
 5 <400> 56

	gcc gag atg cat tcc ttc tgc gcc ttc aag gct gat gat ggt cnt tgt	48
	Ala Glu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Xaa Cys	
	1 5 10 15	
10	aaa gst nnt nns nng cgt ttc ttc ttc aac atc ttc acg cgt cag tgc	96
	Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys	
	20 25 30	
15	sag saa ttc nns tac ggt ggt tgt nns ggt aac cag aac cgg ttc gaa	144
	Xaa Xaa Phe Xaa Tyr Gly Gly Cys Xaa Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu	
	35 40 45	
20	tct cta gag gaa tgt aag aag atg tgc act cgt gac ggc gcc	186
	Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Gly Ala	
	50 55 60	

<210> 57
 <211> 62
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)..(18)
 35 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 45 <221> VARIANTE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 50 <222> (33)..(33)
 <223> xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (34)..(34)
 55 <223> xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE

<222> (41)..(41)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <400> 57

5
 Ala Glu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Xaa Cys
 1 5 10 15
 Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
 20 25 30
 Xaa Xaa Phe Xaa Tyr Gly Gly Cys Xaa Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
 35 40 45
 Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Gly Ala
 50 55 60

15
 <210> 58
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> fragmento sintético
 <400> 58

Lys Arg Pro Arg

25
 <210> 59
 <211> 13
 <212> ADN
 30
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de ADN sintético
 <220>
 <221> CDS
 35
 <222> (1)..(13)
 <400> 59

aaa agg cct cga g
 Lys Arg Pro Arg
 1

40
 <210> 60
 <211> 14
 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 50
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 55
 <222> (12)..(12)
 <223> xaa = cualquier aminoácido
 <400> 60

Lys Arg Glu Ala Ala Glu Pro Trp Gly Ala xaa xaa Leu Glu
 1 5 10

5

<210> 61
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de ADN sintético
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(42)
 <400> 61

10

15

20

aaa agg gaa gcg gcc gag cca tgg ggc gcc taa tag ctc gag
 Lys Arg Glu Ala Ala Glu Pro Trp Gly Ala * * Leu Glu
 1 5 10

42

25

<210> 62
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 62

30

35

Lys Arg Glu Ala Ala Glu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp
 1 5 10 15
 Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe
 20 25 30
 Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln
 35 40 45
 Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55 60
 Gly Ala
 65

45

<210> 63
 <211> 210
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(198)
 <400> 63

50

55

ES 2 514 615 T3

1 aaa agg gaa gcg gcc gag atg cat tcc ttc tgc gct ttc aaa gct gat 48
 Lys Arg Glu Ala Ala Glu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp
 1 5 10 15
 5 gac ggt ccg tgt aaa gct atc atg aaa cgt ttc ttc ttc aac att ttc 96
 Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe
 20 25 30
 10 acg cgt cag tgc gag gaa ttc att tac ggt ggt tgt gaa ggt aac cag 144
 Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln
 35 40 45
 15 aac cgg ttc gaa tct cta gag gaa tgt aag aag atg tgc act cgt gac 192
 Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55 60
 20 ggc gcc taatagctcg ag 210
 Gly Ala
 65

20 <210> 64
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 64

30 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Ala Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 35 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

40 <210> 65
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 65

50 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Ala Gly
 1 5 10 15
 Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 55 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

5 <210> 66
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

10 <400> 66

15 **Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Ser Ala**
1 5 10 15
Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30
Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

20

<210> 67
 <211> 97
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<220>

<221> CDS

30 <222> (7)..(90)

<220>

<221> características_miscláneas

<222> (38)..(38) o g

<223> n = a, t, c o g

35 <220>

<221> características_miscláneas

<222> (43)..(43)

<223> n = a, t, c o g

40 <220>

<221> características_miscláneas

<222> (44)..(44)

<223> n = a, t, c o g

45 <220>

<221> características_miscláneas

<222> (56)..(56)

<223> n = a, t, c o g

50 <220>

<221> características_miscláneas

<222> (59)..(59)

<223> n = a, t, c o g

55 <220>

<221> características_miscláneas

<222> (62)..(62)

<223> n = a, t, c o g

<220>

<221> características_miscláneas

<222> (65)..(65)

<223> n = a, t, c o g

ES 2 514 615 T3

<400> 67
cctcct atg cat tcc ttc tgc gcc ttc aag gct ras rnt ggt nnt tgt 48
Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala xaa xaa Gly xaa Cys
1 5 10

5
ara gst rnt cns cns cgt tks ttc ttc aac atc ttc acg cgt 90
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg xaa Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
15 20 25

tccctcc 97

10

<210> 68
 <211> 23
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de ADN sintético

20 <400> 68
 23 ggaggaacg cgtgaagatg ttg
 <210> 69
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)

30 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>

40 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>

45 <221> VARIANTE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>

50 <221> VARIANTE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>

55 <221> VARIANTE
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

ES 2 514 615 T3

<220>

<221> VARIANTE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

5 <400> 69

10 Met His ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Xaa Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
20 25

15

Reivindicaciones

1. Un polipéptido que inhibe la calicreína que comprende una estructura de dominio Kunitz que comprende la secuencia de aminoácidos:

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Cys-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Gly-Xaa13-
Cys-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Xaa22-Xaa23-Xaa24-Xaa25-
Xaa26-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Cys-Xaa31-Xaa32-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Gly-Cys-
Xaa39-Xaa40-Xaa41-Xaa42-Xaa43-Xaa44-Xaa45-Xaa46-Xaa47-Xaa48-Xaa49-Xaa50-
Cys-Xaa52-Xaa53-Xaa54-Cys-Xaa56-Xaa57-Xaa58,

en donde:

Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 o Xaa58 pueden estar ausentes;
Xaa10 se selecciona a partir de Asp, Glu, Ala, Gly, Ser, y Thr;
Xaa11 se selecciona a partir de Asp, Gly, Ser, Val, Glu, Leu, Met, Asn, Ile, Ala y Thr;
Xaa13 se selecciona a partir de Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys y Gln;
Xaa15 se selecciona a partir de Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn y Gln;
Xaa16 se selecciona a partir de Ala, Gly, Ser, Asp, y Asn;
Xaa17 se selecciona a partir de Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln y Thr;
Xaa18 se selecciona a partir de His, Leu, Gln, y Ala;
Xaa19 se selecciona a partir de Pro, Gln, Leu, Asn, y Ile;
Xaa20 se selecciona a partir de Arg, Leu, Ala, Ser, Lys, Gln, y Val;
Xaa21 se selecciona a partir de Trp, Phe, Tyr, His y Ile;
Xaa22 se selecciona a partir de Tyr y Phe;
Xaa23 se selecciona a partir de Tyr y Phe;
Xaa31 se selecciona a partir de Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile y Thr;
Xaa32 se selecciona a partir de Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly y Val;
Xaa33 se selecciona a partir de Phe y Tyr;
Xaa34 se selecciona a partir de Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly y Leu;
Xaa35 se selecciona a partir de Tyr, Trp y Phe;
Xaa36 se selecciona a partir de Gly, Ser y Ala;
Xaa39 se selecciona a partir de Gly, Glu, Ala, Ser y Asp;
Xaa40 se selecciona a partir de Gly y Ala;
Xaa43 se selecciona a partir de Asn y Gly; y
Xaa45 se selecciona a partir de Phe y Tyr;

para su uso en el tratamiento o prevención del edema de la piel, tejido subcutáneo, la laringe, el tracto respiratorio superior o el tracto gastrointestinal en un paciente, en donde dicho edema se asocia con excesiva actividad de calicreína

2. El polipéptido para uso de la reivindicación 1, en donde el polipéptido inhibidor de la calicreína comprende la secuencia de aminoácidos y en donde:

Xaa10 se selecciona a partir de Asp, y Glu;
Xaa11 se selecciona a partir de Asp, Gly, Ser, y Val;
Xaa13 se selecciona a partir de Arg, His, Pro, Asn, y Ser;
Xaa15 se selecciona a partir de Arg, y Lys;
Xaa16 se selecciona a partir de Ala, y Gly;
Xaa17 se selecciona a partir de Ala, Asn, Ser, y Ile;
Xaa18 se selecciona a partir de His, Leu, y Gln;
Xaa19 se selecciona a partir de Pro, Gln, y Leu;
Xaa20 es Arg;
Xaa21 se selecciona a partir de Trp, y Phe;
Xaa31 es Glu;

- 5 Xaa32 se selecciona a partir de Glu, y Gln;
 Xaa33 es Phe;
 Xaa34 se selecciona a partir de Thr, Ile, y Ser
 Xaa35 es Tyr;
 Xaa36 es Gly; y
 Xaa39 se selecciona a partir de Gly, Glu, y Ala.
- 10 3. El polipéptido para uso de la reivindicación 2, en donde el polipéptido inhibidor de la calicreína comprende la secuencia de aminoácidos y en donde:
- 15 Xaa10 es Asp;
 Xaa11 se selecciona a partir de Asp, y Gly;
 Xaa13 se selecciona a partir de Arg, y His;
 Xaa15 es Arg;
 Xaa16 se selecciona a partir de Ala, y Gly;
 Xaa17 se selecciona a partir de Ala, y Asn;
 Xaa18 es His; y
 Xaa19 se selecciona a partir de Pro, Gln, y Leu
- 20 4. El polipéptido para uso de la reivindicación 1, en donde el péptido inhibidor de calicreína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en sec. con núm. de ident.:5, sec. con núm. de ident.:6, sec. con núm. de ident.:7, sec. con núm. de ident.:8, sec. con núm. de ident.:9, sec. con núm. de ident.:10, sec. con núm. de ident.:11, sec. con núm. de ident.:14, sec. con núm. de ident.:15, sec. con núm. de ident.:16, sec. con núm. de ident.:17, sec. con núm. de ident.:19, sec. con núm. de ident.:20, sec. con núm. de ident.:21, sec. con núm. de ident.:22, sec. con núm. de ident.:23, sec. con núm. de ident.:24, sec. con núm. de ident.:25, sec. con núm. de ident.:26, sec. con núm. de ident.:27, sec. con núm. de ident.:28, sec. con núm. de ident.:29, sec. con núm. de ident.:30, sec. con núm. de ident.:31, sec. con núm. de ident.:32, sec. con núm. de ident.:34, sec. con núm. de ident.:36, sec. con núm. de ident.:38, sec. con núm. de ident.:40, sec. con núm. de ident.:46, sec. con núm. de ident.:51, sec. con núm. de ident.:54 y sec. con núm. de ident.:55.
- 30 5. Uso de un polipéptido inhibidor de la calicreína que comprende una estructura de dominio Kunitz que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se define en la reivindicación 1, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el edema de la piel, tejido subcutáneo, la laringe, el tracto respiratorio superior o el tracto gastrointestinal en un paciente, en donde dicho edema se asocia con actividad excesiva de la calicreína.
- 35 6. El uso de la reivindicación 5, en donde el polipéptido inhibidor de calicreína comprende la secuencia de aminoácidos y en donde
- 40 Xaa10 se selecciona a partir de Asp, y Glu;
 Xaa11 se selecciona a partir de Asp, Gly, Ser, y Val;
 Xaa13 se selecciona a partir de Arg, His, Pro, Asn, y Ser;
 Xaa15 se selecciona a partir de Arg, y Lys;
 Xaa16 se selecciona a partir de Ala, y Gly;
 Xaa17 se selecciona a partir de Ala, Asn, Ser, y Ile;
 Xaa18 se selecciona a partir de His, Leu, y Gln;
 Xaa19 se selecciona a partir de Pro, Gln, y Leu;
 Xaa20 es Arg;
 Xaa21 se selecciona a partir de Trp, y Phe;
 Xaa31 es Glu;
 Xaa32 se selecciona a partir de Glu, y Gln;
 Xaa33 es Phe;
 Xaa34 se selecciona a partir de Thr, Ile, y Ser
 Xaa35 es Tyr;
 Xaa36 es Gly; y
 Xaa39 se selecciona a partir de Gly, Glu, y Ala.
- 55

7. El uso de la reivindicación 6, en donde el polipéptido inhibidor de la calicreína comprende la secuencia de aminoácidos y en donde

- 5 Xaa10 es Asp;
Xaa11 se selecciona a partir de Asp, y Gly;
Xaa13 se selecciona a partir de Arg, y His;
Xaa15 es Arg;
Xaa16 se selecciona a partir de Ala, y Gly;
10 Xaa17 se selecciona a partir de Ala, y Asn;
Xaa18 es His; y
Xaa19 se selecciona a partir de Pro, Gln, y Leu

8. El uso de la reivindicación 5, en el que el polipéptido inhibidor de la calicreína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en sec. con núm. de ident.:5, sec. con núm. de ident.:6, sec. con núm. de ident.:7, sec. con núm. de ident.:8, sec. con núm. de ident.:9, sec. con núm. de ident.:10, sec. con núm. de ident.:11, sec. con núm. de ident.:14, sec. con núm. de ident.:15, sec. con núm. de ident.:16, sec. con núm. de ident.:17, sec. con núm. de ident.:19, sec. con núm. de ident.:20, sec. con núm. de ident.:21, sec. con núm. de ident.:22, sec. con núm. de; ident.:23, sec. con núm. de ident.:24, sec. con núm. de ident.:25, sec. con núm. de ident.:26, sec. con núm. de ident.:27, sec. con núm. de ident.:28, sec. con núm. de ident.:29, sec. con núm. de ident.:30, sec. con núm. de ident.:31, sec. con núm. de ident.:32, sec. con núm. de ident.:34, sec. con núm. de ident.:36, sec. con núm. de ident.:38, sec. con núm. de ident.:40 sec. con núm. de ident.:46, sec. con núm. de ident.:51, sec. con núm. de ident.:54 y sec. con núm. de ident.:55.