(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 528 254**

(51) Int. CI.:

A61K 38/55 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
C12N 15/15 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2003 E 10180484 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2311432**

(54) Título: **Polipéptidos de dominio Kunitz modificado y su uso para reducir la isquemia o el inicio de una respuesta inflamatoria sistémica asociada con un procedimiento quirúrgico**

(30) Prioridad:

07.06.2002 US 387239 P
28.08.2002 US 407003 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2015

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

LADNER, ROBERT CHARLES y
LEY, ARTHUR C.

(74) Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

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

Polipéptidos de dominio Kunitz modificado y su uso para reducir la isquemia o el inicio de una respuesta inflamatoria sistémica asociada con un procedimiento quirúrgico

Antecedentes de la invención

Las proteasas están implicadas en una amplia gama de rutas biológicas. En particular, las proteasas de serina tales como la calicreína, plasmina, elastasa, activador de plasminógeno uroquinasa, trombina, inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteína humana, y factores de coagulación tales como los factores VIIa, IXa, Xa, XIa, y XIIa se han implicado en las vías que afectan el flujo sanguíneo, *por ejemplo,* la isquemia general y focal, invasión tumoral, fibrinólisis, pérdida de sangre perioperatoria, e inflamación. Inhibidores de proteasas de serina específicos, por lo tanto, han recibido atención como posibles objetivos para fármaco de varias enfermedades isquémicas.

Un inhibidor de este tipo, aprotinina (denominado además inhibidor de tripsina pancreática bovina o BPTI), obtenido a partir de pulmón bovino, se aprobó en los Estados Unidos para el uso profiláctico en la reducción de la pérdida de sangre perioperatoria y la necesidad de transfusión en pacientes sometidos a la derivación cardiopulmonar (CPB), *por ejemplo,* en el curso de un procedimiento de injerto de derivación de la arteria coronaria. La aprotinina se comercializa bajo el nombre comercial TRASYLOL® (Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut) y previamente se aprobó para su uso en el tratamiento de la pancreatitis. La efectividad de la aprotinina está asociada con sus capacidades relativamente inespecíficas de inhibir una variedad de proteasas de serina, incluyendo calicreína plasmática y plasmina. Estas proteasas son importantes en una serie de rutas del sistema de activación de contacto (CAS).

CAS es inicialmente activado cuando la sangre completa se pone en contacto con la superficie de sustratos foráneos (*por ejemplo,* caolín, vidrio, sulfato de dextrano, o superficies óseas dañadas). Calicreína, una proteasa de serina, es una enzima plasmática que inicia la cascada de CAS conduciendo a la activación de neutrófilos, plasmina, coagulación, y varias cininas. Calicreína se secreta como un zimógeno (pre-calicreína) que circula como una molécula inactiva hasta activarse por un evento proteolítico temprano en la cascada de activación de contacto. Ciertamente, la inhibición específica de la calicreína puede ser un enfoque muy atractivo para el control de la pérdida de sangre asociado con la CPB y el inicio de la respuesta inflamatoria sistémica (SIR) como puede encontrarse durante, por ejemplo, varios procedimientos quirúrgicos invasivos.

A pesar de ser el único compuesto con licencia para prevenir la pérdida de sangre perioperatoria en la CPB para los procedimientos de injerto de la derivación de la arteria coronaria (CABG), la aprotinina es no tan ampliamente usada como podría esperarse. Existen serias preocupaciones acerca del uso de este polipéptido bovino en pacientes que requieren la CPB, y en particular el uso de este compuesto en los procedimientos de CABG. La aprotinina no es específica para la calicreína, pero interactúa con enzimas adicionales (*por ejemplo,* plasmina) en múltiples rutas. Así, el mecanismo de acción de la aprotinina es ampliamente especulativo, y la falta de comprensión precisa de qué se afecta durante el tratamiento con la aprotinina produce el riesgo de complicaciones durante el tratamiento. Una complicación frecuentemente citada es la trombosis incontrolada, debido a las acciones de aprotinina en la vía fibrinolítica. Existe preocupación no sólo sobre tales eventos hiperagudos como la trombosis del vaso mayor en el período perioperatorio, sino también sobre la permeabilidad del injerto después del procedimiento de CABG. Además, como una proteína de origen natural obtenida de pulmón bovino, la administración de la aprotinina en seres humanos puede inducir reacciones de hipersensibilidad severa o anafilácticas o anafilactoides después de la primera y más frecuentemente, después de la administración repetida a los pacientes. Esta es particularmente la preocupación en el gran número de pacientes que tienen procedimientos de CABG repetidos. Adicionalmente, existe una creciente preocupación pública acerca del uso del material derivado de fuentes bovinas como un vector potencial para la transmisión de la encefalopatía espongiforme bovina a los seres humanos.

Las preocupaciones dejan claro que continúan siendo una necesidad los medios y métodos más eficaces y más específicos para prevenir o reducir pérdida de sangre perioperatoria y el inicio de la SIR en un paciente sometido a cirugía, lo que resulta en la activación de CAS, tales como los procedimientos de CABG en pacientes de la CPB, o reemplazo de cadera.

Breve descripción de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones.

Esta presente descripción que incluye la invención se basa en el descubrimiento de péptidos que inhiben las proteasas de serina. Proteasas de serina tal como, por ejemplo, la calicreína, están implicadas en, por ejemplo, las vías que conducen a la pérdida excesiva de sangre perioperatoria y el inicio de la respuesta inflamatoria sistémica. Inhibidores de péptido

calicreína preferidos incluyen los descritos en la patente de Estados Unidos núms. 6,333,402 y 6,057,287 en Markland y otros Está dirigida en parte al uso de los péptidos en métodos terapéuticos y composiciones adecuadas para usar en la eliminación o reducción de varias isquemias, que incluyen pero sin limitarse a la pérdida de sangre perioperatoria, y el inicio de la respuesta inflamatoria sistémica. La pérdida de sangre perioperatoria resulta de los procedimientos invasivos quirúrgicos que conducen a la activación por contacto de los componentes del complemento y los sistemas de coagulación/fibrinólisis. Más específicamente, la invención proporciona métodos para usar inhibidores de la calicreína para reducir o prevenir la pérdida de sangre perioperatoria y una respuesta inflamatoria sistémica en pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos invasivos, especialmente cirugía cardiotorácica.

En un ejemplo, la presente descripción que comprende la invención se dirige a un método para prevenir o reducir la isquemia en un paciente que comprende administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos: Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (sec. con núm. de ident.:1), en donde Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 o Xaa58 son cada uno individualmente un aminoácido o está ausente; Xaa10 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asp y Glu; Xaa11 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala y Thr; Xaa13 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys y Gln; Xaa15 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn y Gln; Xaa16 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Gly, Ser, Asp y Asn; Xaa17 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln y Thr; Xaa18 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: His, Leu, Gln y Ala; Xaa19 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Pro, Gln, Leu, Asn e Ile; Xaa21 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Trp, Phe, Tyr, His e Ile; Xaa22 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe; Xaa23 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe; Xaa31 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile y Thr; Xaa32 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Gln, Asp Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly y Val; Xaa34 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly y Leu; Xaa35 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr, Trp y Phe; Xaa39 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Gly, Ala, Ser y Asp; Xaa40 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Gly y Ala; Xaa43 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gly; Xaa45 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Phe y Tyr; y en donde el polipéptido inhibe la calicreína.

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

En una modalidad particular, posiciones de aminoácidos individuales de sec. con núm. de ident.:1 son: Xaa10 es Asp, Xaa11 es Asp, Xaa13 es Pro, Xaa15 es Arg, Xaa16 es Ala, Xaa17 es Ala, Xaa18 es His, Xaa19 es Pro, Xaa21 es Trp, Xaa31 es Glu, Xaa32 es Glu, Xaa34 es Ile, Xaa35 es Tyr, Xaa39 es Glu.

En otro ejemplo, la presente descripción que comprende la invención se dirige a un método para prevenir o reducir el inicio de la respuesta inflamatoria sistémica asociada con un procedimiento quirúrgico en un paciente que comprende administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos: Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (sec. con núm. de ident.:1), en donde Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 o Xaa58 son cada uno individualmente un aminoácido o está ausente; Xaa10 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asp y Glu; Xaa11 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala y Thr; Xaa13 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys y Gln; Xaa15 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn y Gln; Xaa16 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Gly, Ser, Asp y Asn; Xaa17 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln y Thr; Xaa18 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: His, Leu, Gln y Ala; Xaa19 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Pro, Gln, Leu, Asn e Ile; Xaa21 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Trp, Phe, Tyr, His e Ile; Xaa22 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe; Xaa23 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe; Xaa31 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile y Thr; Xaa32 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Gln, Asp Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly y Val; Xaa34 es un aminoácido seleccionado del grupo que

consiste en: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly y Leu; Xaa35 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr, Trp y Phe; Xaa39 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Gly, Ala, Ser y Asp; Xaa40 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Gly y Ala; Xaa43 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asn y Gly, Xaa45 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Phe y Tyr; y en donde el polipéptido inhibe la calicreína. En un caso particular, el procedimiento quirúrgico puede ser una cirugía cardiotorácica, tal como, por ejemplo, derivación cardiopulmonar o injerto de derivación de la arteria coronaria. En una modalidad ejemplo particular, las posiciones de aminoácidos individuales de sec. con núm. de ident.:1 son: Xaa10 es Asp, Xaa11 es Asp, Xaa13 es Pro, Xaa15 es Arg, Xaa16 es Ala, Xaa17 es Ala, Xaa18 es His, Xaa19 es Pro, Xaa21 es Trp, Xaa31 es Glu, Xaa32 es Glu, Xaa34 es Ile, Xaa35 es Tyr, Xaa39 es Glu.

Aun en otro ejemplo, la presente descripción se dirige a un método para prevenir o reducir el inicio de la respuesta inflamatoria sistémica asociada con un procedimiento quirúrgico en un paciente que comprende administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 de sec. con núm. de ident.:2), en donde el polipéptido inhibe la calicreína. En un ejemplo, el procedimiento quirúrgico es a cirugía cardiotorácica, tal como, por ejemplo, derivación cardiopulmonar o injerto de derivación de la arteria coronaria.

En otro ejemplo, la presente descripción se dirige a un método para prevenir o reducir la isquemia en un paciente que comprende administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 de la sec. con núm. de ident.:2), en donde el polipéptido inhibe la calicreína. En un caso particular, la isquemia puede ser pérdida de sangre perioperatoria debida a un procedimiento quirúrgico realizado al paciente. En un ejemplo, el procedimiento quirúrgico es una cirugía cardiotorácica, tal como, por ejemplo, derivación cardiopulmonar o injerto de derivación de la arteria coronaria.

Aun en otra modalidad, la invención se dirige a un método para prevenir o reducir el inicio de la respuesta inflamatoria sistémica asociada con un procedimiento quirúrgico en un paciente que comprende administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos: Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 5-60 de sec. con núm. de ident.:2), en donde el polipéptido inhibe la calicreína. En una modalidad, el procedimiento quirúrgico es una cirugía cardiotorácica, tal como, por ejemplo, derivación cardiopulmonar o injerto de derivación de la arteria coronaria.

En otra modalidad, la invención se dirige a un método para prevenir o reducir la isquemia en un paciente que comprende administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos: Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 5-60 of sec. con núm. de ident.:2), en donde el polipéptido inhibe la calicreína. En una modalidad particular, la isquemia puede ser pérdida de sangre perioperatoria debida a un procedimiento quirúrgico realizado al paciente. En una modalidad, el procedimiento quirúrgico es una cirugía cardiotorácica, tal como, por ejemplo, derivación cardiopulmonar o injerto de derivación de la arteria coronaria.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama simplificado de las principales rutas múltiples y eventos relacionados implicados en sistema de activación de contacto y respuesta inflamatoria sistémica (SIR) que puede surgir en un paciente sometido a traumatismo de tejido óseo o blando tal como el que se asocia con un procedimiento de injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG), especialmente cuando el procedimiento CABG implica circulación extracorpórea, tal como derivación cardiopulmonar (aparato de derivación coronaria). Las flechas indican la activación de un componente o evento a otro componente o evento en la cascada. Las flechas en ambas direcciones indican efectos de activación de componentes o eventos en ambas direcciones. Las flechas quebradas indican la participación probable de un componente o evento en la activación de otro componente o evento. Las abreviaturas son como sigue: "tPA" = activador tisular del plasminógeno; "C5a" = un componente proteico del sistema del complemento; "fXIIa" = proteína activadora de la precalicreína para formar la calicreína activa; "Extrínseco" = sistema de coagulación extrínseco; "Intrínseco" = sistema de coagulación intrínseco.

La FIG. 2 muestra una porción de un ADN y una secuencia de aminoácido deducida correspondiente de un polipéptido KI de la presente descripción en el plásmido pPIC-K503. El ADN insertado codifica el péptido señal matα prepro de *Saccharomyces cerevisiae* (subrayado) fusionado con marco del amino terminal del polipéptido KI PEP-1 que tiene la secuencia de aminoácidos delimitada por el área en caja. La secuencia de aminoácidos del polipéptido PEP-1 KI mostrada en la región en caja es la sec. con núm. de ident.:2, y la secuencia codificante del nucleótido correspondiente del polipéptido KI es la sec. con núm. de ident.:3. Las flechas punteadas indican el lugar y dirección de dos secuencias iniciadoras de PCR en las regiones AOX que se usaron para producir los moldes de la secuenciación. La secuencia de ADN para la secuencia nucleotídica completa de la figura comprende la secuencia codificante estructural para la proteína de fusión y se denomina como sec. con núm. de ident.:27. La porción de la secuencia subrayada doble indica una secuencia de sonda diagnóstica. *Bst*BI y *Eco*RI indican los lugares en la secuencia de sus respectivos sitios palindrómicos, hexaméricos de restricción de endonucleasa. Los asteriscos denotan codones de parada de la traducción. Las Figs. 3A y 3B muestran un alineamiento de las secuencias de aminoácidos del ejemplo preferido de la presente descripción, la secuencia LACI nativa de la que se derivaron estas variantes (sec. con núm. de ident.:32), y otros dominios Kunitz conocidos (sec. con núms. de ident:29-31 y 33-53). Los residuos conservados están resaltados.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones.

La presente descripción que incluyen la invención se basa en el descubrimiento de un grupo de polipéptidos inhibidores de calicreína (KI) que inhiben la calicreína plasmática con una especificidad que permite su uso en métodos mejorados para prevenir o reducir la isquemia tal como, por ejemplo, pérdida de sangre perioperatoria y/o una respuesta inflamatoria sistémica (SIR) inducida por calicreína, especialmente, por ejemplo, en pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos y particularmente procedimientos quirúrgicos que implican cirugía cardiotorácica, *por ejemplo*, la derivación cardiopulmonar (CPB), tal como procedimientos de injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG). KIs pueden usarse específicamente para, *por ejemplo*, cirugía cardíaca pediátrica, transplante de pulmón, reemplazo total de cadera y transplante ortopédico del hígado, y para reducir o prevenir el derrame cerebral perioperatorio durante CABG, oxigenación de la membrana extracorpórea (ECMO) y accidentes cerebrovasculares (CVA) durante los procedimientos.

La cirugía cardiotorácica es la cirugía del área del pecho, más comúnmente los pulmones y el corazón. Enfermedades típicas tratadas por cirugía cardiotorácica incluyen enfermedad de la arteria coronaria, tumores y cánceres del pulmón, esófago y pared torácica, anomalías en las válvulas o vaso del corazón, y defectos de nacimiento que implican el corazón o el pecho. Donde la cirugía cardiotorácica se utiliza para el tratamiento, se incurre en el riesgo de la pérdida de sangre (*por ejemplo* ,isquemia inducida por cirugía) y el inicio de una respuesta inflamatoria sistémica (SIR). SIR inducida por la cirugía puede resultar en una disfunción orgánica severa (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; SIRS).

Utilidad del polipéptido en la invención

Polipéptidos KI útiles en la presente descripción que comprenden la invención incluyen los polipéptidos de dominio Kunitz. En una modalidad los dominios Kunitz son formas variante de la estructura en bucle que comprende el dominio Kunitz 1 de la proteína inhibidora de la coagulación asociada a lipoproteína humana (LACI). LACI contiene tres estructuras peptídicas internas, bien definidas, en bucle que son dominios Kunitz paradigmas (Girard, T. y otros, 1989. Nature, 338:518-520). Los tres dominios Kunitz de LACI le confieren la capacidad de ligarse e inbihir la calicreína, aunque no con afinidad excepcional. Variantes del dominio Kunitz 1 de LACI descritos en la presente, se han tamizado, aislado y unido a la calicreína con especificidad y afinidad mejorada (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos núms. 5,795,865 y 6,057,287). Un ejemplo de un polipéptido preferido útil en la presente descripción tiene la secuencia de aminoácidos definida por los aminoácidos 3-60 de la sec. con núm. de ident.:2.

Cada polipéptido útil en la invención se une a la calicreína, y polipéptidos preferidos son además los inhibidores de la calicreína (KI) como determinado usando los ensayos de inhibición y unión a la calicreína conocidos en la técnica La especificidad y afinidad mejorada de los polipéptidos de dominio Kunitz variante a la calicreína descritos en la presente proporciona la base para su uso en la cirugía cardiotorácica, *por ejemplo,* procedimientos quirúrgicos de la CPB y especialmente de CABG, para prevenir o reducir la pérdida de sangre perioperatoria y el inicio de SIR en pacientes sometidos a dichos procedimientos. Los polipéptidos KI usados en la presente descripción tienen o comprenden la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de dominio Kunitz variante originalmente aislado mediante el tamizaje con bibliotecas de presentación de fago con capacidad de unirse a la calicreína.

Polipéptidos KI útiles en los métodos y composiciones de la presente descripción que comprenden la invención incluyen un polipéptido 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 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39
Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys
Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa5(sec. con núm. de dent.:1)

"Xaa" se refiere a una posición en una cadena peptídica que puede ser cualquiera de un número de diferentes aminoácidos. Por ejemplo, para los péptidos KI descritos en la presente descripción, Xaa10 puede ser Asp o Glu; Xaa11 puede ser Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala o Thr; Xaa13 puede ser Pro, Arg, His, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys o Gln; Xaa15 puede ser Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn o Gln; Xaa16 puede ser Ala, Gly, Ser, Asp o Asn; Xaa17 puede ser Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln o Thr; Xaa18 puede ser His, Leu, Gln o Ala; Xaa19 puede ser Pro, Gln, Leu, Asn o Ile; Xaa21 puede ser Trp, Phe, Tyr, His o Ile; Xaa31 puede ser Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile o Thr; Xaa32 puede ser Glu, Gln, Asp Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly o Val; Xaa34 puede ser Ile, Thr, Ser, Val, Ala, Asn, Gly o Leu; Xaa35 puede ser Tyr, Trp o Phe; Xaa39 puede ser Glu, Gly, Ala, Ser o Asp. Los aminoácidos Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 y Xaa54 pueden ser cualquier aminoácido. Además, cada uno de los primeros cuatro y los tres últimos aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1 pueden estar opcionalmente presentes o ausentes y puede ser cualquier aminoácido, si está presente.

Los péptido definidos de conformidad con la sec. con núm. de ident.:1 forman un conjunto de polipéptidos que se unen a la calicreína. Por ejemplo, en un ejemplo preferido de la presente descripción un polipéptido KI útil en los métodos y composiciones de la presente descripción tiene las siguientes posiciones variables: Xaa11 puede ser Asp, Gly, Ser o Val; Xaa13 puede ser Pro, Arg, His o Asn; Xaa15, puede ser Arg o Lys; Xaa16 puede ser Ala o Gly; Xaa17 puede ser Ala, Asn, Ser o Ile; Xaa18 puede ser His, Leu o Gln; Xaa19 puede ser Pro, Gln o Leu; Xaa21 puede ser Trp o Phe; Xaa31 es Glu; Xaa32 puede ser Glu o Gln; Xaa34 puede ser Ile, Thr o Ser; Xaa35 es Tyr; y Xaa39 puede ser Glu, Gly o Ala.

Un ejemplo más específico de la presente descripción que comprende la invención reivindicada se define por los siguientes aminoácidos en las posiciones variables: Xaa10, es Asp; Xaa11 es Asp; Xaa13 puede ser Pro o Arg; Xaa15 es Arg; Xaa16 puede ser Ala o Gly, Xaa17 es Ala; Xaa18 es His; Xaa19 es Pro;Xaa21 es Trp; Xaa31 es Glu; Xaa32 es Glu; Xaa34 puede ser Ile o Ser; Xaa35 es Tyr; y Xaa39 es Gly.

Se incluyen además dentro del alcance de la invención los polipéptidos que comprenden porciones de los polipéptidos descritos en la presente invención. Por ejemplo, los polipéptidos pueden comprender dominios de unión para epítopos específicos de la calicreína. Se pueden incluir además tales fragmentos de los polipéptidos descritos en la presente invención.

Polipéptidos KI útiles en los métodos y composiciones descritas en la presente invención comprenden un dominio Kunitz. Un subconjunto de las secuencias incluidas en la sec. con núm. de ident.:1 se describen a continuación (donde no se indica, "Xaa" se refiere al mismo conjunto de aminoácidos que se tiene en cuenta en la sec. con núm. de ident.:1):

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16
Xaa17 Xaa18 Xaa19 Arg Xaa21 Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Xaa31
Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (sec. con núm. de ident.:54)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys (
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg As

(aminoácidos 3-60 de sec. con núm. de ident.:2)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Asn His Leu
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident.:4)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Thr Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident.:5)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Gln Phe Thr Tyr Gly Gly Cys
Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident.:6)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Ser Leu Pro
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(sec. con núm. de ident.:7)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident.:8)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly Ala His Leu
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(sec. con núm. de ident.:9)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Lys Gly Ala His Leu
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gl
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(sec. con núm. de ident.:10)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident. :11)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident.:12)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident.:13)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala Gln Pro
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp Sec. con núm. de ident.: 14

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Leu
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident.:15)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Gly Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Gln
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident.:16)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Gly Ala His Leu
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident. :17)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Arg Gly Ala Leu Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident.: 18:),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Asn Cys Arg Gly Asn Leu Pro
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident.:19),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Arg Cys Arg Gly Asn His Gln
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident.:20)

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Ala Ile Gln Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident.:21),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (sec. con núm. de ident.:22).

Las Figs. 3A y 3B proporcionan un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de estas secuencias, la secuencia LACI nativa de la que se derivaron estas variantes (sec. con núm. de ident.:32), y otros dominios Kunitz conocidos (sec. con núms. de ident: 29-31 y 33-53).

Los polipéptidos KI útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente invención se pueden elaborar sintéticamente usando cualquier protocolo y equipo estándar de síntesis de polipéptido. Por ejemplo, la síntesis gradual de un polipéptido KI descrita en la presente invención puede llevarse a cabo mediante la eliminación de un grupo protector amino (N) terminal de un aminoácido inicial (*es decir,* carboxi-terminal), y el acoplamiento a él del extremo carboxilo del siguiente aminoácido en la secuencia del polipéptido. Este aminoácido es también adecuadamente protegido. El grupo carboxilo del aminoácido entrante puede activarse para que reaccione con el N-terminal del aminoácido unido por la formación en un grupo reactivo tales como formación en una carbodiimida, un anhídrido de ácido simétrico, o un grupo "ester activo" tales como ésteres de hidroxibenzotriazol o pentafluorofenilo. Los métodos de síntesis de péptido en fase sólida preferidos incluyen el método BOC, que utiliza el tert-butloxicarbonilo como el grupo protector α-amino, y el método FMOC, que utiliza 9-fluorenilmetloxicarbonilo para proteger el α-amino de los residuos de aminoácidos. Ambos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica (Stewart, J. y Young, J., Solid-Phase Peptide Synthesis (W. H. Freeman Co.; San Francisco 1989); Merrifield, J., 1963. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154; Bodanszky, M. y Bodanszky, A., The Practice of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, Nueva York 1984). Si se desea, aminoácidos adicionales amino- y/o carboxi-terminal se pueden denominar en la secuencia de aminoácidos y añadir durante la síntesis del polipéptido.

Alternativamente, polipéptidos de dominio Kunitz y polipéptidos KI útiles en las composiciones y métodos de la presente descripción que comprende la invención se pueden producir por métodos recombinantes usando cualquier número de células y vectores de la expresión correspondientes, incluyendo pero sin limitarse a vectores de expresión bacteriana, vectores de expresión de levadura, vectores de expresión de baculovirus, vectores de expresión viral en mamífero, y similares. Polipéptidos de dominio Kunitz y polipéptidos KI útiles en las composiciones y métodos de la invención se pueden producir transgénicamente usando moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia codificante para un dominio Kunitz o polipéptido KI descritas en la presente invención, en donde la molécula de ácido nucleico puede integrarse dentro y expresarse a partir del genoma de un animal huésped usando métodos transgénicos disponibles en la técnica. En algunos casos, puede ser necesario o ventajoso fusionar la secuencia codificante de un polipéptido de dominio Kunitz o un polipéptido que comprende el dominio Kunitz a otra secuencia codificante en un vector de expresión para formar un polipéptido de fusión que es fácilmente expresado en una célula huésped. Preferentemente, la célula huésped que expresa tal polipéptido de fusión procesa además el polipéptido de fusión para rendir un dominio Kunitz o polipéptido KI útil en la presente descripción que contiene sólo la secuencia de aminoácido deseada. Obviamente, si cualquier otro(s) aminoácido(s) permanece unido al dominio Kunitz o polipéptido KI expresado, tal(es) aminoácido(s) adicional(es) no deben disminuir la unión a la calicreína y/o actividad inhibidora para la calicreína del dominio Kunitz o polipéptido KI tal que se impida el uso del polipéptido en las composiciones o métodos de la presente descripción.

Un sistema de expresión recombinante preferido para producir polipéptidos KI útiles en las composiciones y métodos descritos en la presente invención es un vector de expresión de levadura, que permite una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos para un polipéptido KI o polipéptido de dominio Kunitz que se enlaza en el mismo marco de lectura con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de péptido líder prepro mata de *Saccharomyces cerevisiae,* que a su vez está bajo el control de un promotor de levadura operable. El plásmido de expresión recombinante en levadura resultante puede transformarse después por métodos estándar en las células de un huésped de levadura adecuado, compatible, cuyas células sean capaces de expresar la proteína recombinante a partir del vector de expresión recombinante de levadura. Preferentemente, una célula huésped de levadura transformada con tal vector de expresión recombinante es además capaz de procesar la proteína de fusión para proporcionar un polipéptido activo KI útil en las composiciones y métodos de la presente descripción. Un huésped de levadura preferido para producir polipéptidos de dominio Kunitz recombinante y polipéptidos KI que comprenden tales dominios Kunitz es *Pichia pastoris.*

Como indicado anteriormente, polipéptidos KI que son útiles en los métodos y composiciones descritas en la presente invención pueden comprender un polipéptido de dominio Kunitz descrito en la presente invención. Algunos polipéptidos KI pueden comprender una secuencia de flanqueo adicional, preferentemente de uno a seis aminoácidos de longitud, en el extremo amino o carboxi-terminal, siempre y cuando tales aminoácidos adicionales no disminuyan significativamente la afinidad de unión a la calicreína o actividad inhibidora de la calicreína tal que impida su uso en los métodos y composiciones descritos en la presente invención. Tales aminoácidos adicionales pueden añadirse deliberadamente para expresar un polipéptido KI en una célula huésped recombinante determinada o puede añadirse para proporcionar una función adicional, *por ejemplo,* para proporcionar un péptido que enlaza el polipéptido KI a otra molécula o para proporcionar una porción de afinidad que facilita la purificación del polipéptido. Preferentemente, el(los) aminoácido(s) adicional(es) no incluyen cisteína, lo que puede interferir con los enlaces disulfuro del dominio Kunitz.

Un ejemplo de un polipéptido de dominio Kunitz preferido útil en los métodos y composiciones de la invención tiene la secuencia de aminoácidos de los residuos 5-60 de la sec. con núm. de ident.:2. Cuando expresado y procesado en un

sistema de expresión de proteínas de fusión de levadura (*por ejemplo,* basado en el plásmido de expresión de integración pHIL-D2), tal polipéptido de dominio Kunitz conserva un dipéptido Glu-Ala de amino terminal adicional a partir de la fusión con la secuencia del péptido líder prepro matα de *S. cerevisiae.* Cuando segregada de la célula huésped de levadura, la mayoría del péptido líder es procesado a partir de la proteína de fusión para producir un polipéptido KI funcional (denominado en la presente descripción como "PEP-1") que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:2 (ver región en caja en la FIG. 2).

Particularmente polipéptidos KI preferidos útiles en los métodos y composiciones descritas en la presente invención tienen una afinidad de unión a la calicreína que está en el orden de 1000 veces superior a la de la aprotinina, la cual está actualmente aprobada para su uso en procedimientos de CABG para reducir la pérdida de sangre. Las afinidades de unión sorprendentemente altas de tales polipéptidos KI descritas en la presente invención indican que tales polipéptidos KI exhiben un alto grado de especificidad para la calicreína en la exclusión de otros objetivos moleculares (ver Tabla 1, más abajo). Así, el uso de tales polipéptidos de acuerdo con presente descripción que comprende la invención reduce gran parte de la especulación en cuanto a los posibles objetivos terapéuticos en un paciente El grado inferior de especificidad exhibido por, por ejemplo, aprotinina, conduce a posibles efectos secundarios pleiotrópicos y ambigüedad en cuanto a su mecanismo terapéutico.

Los polipéptidos definidos por, por ejemplo, la sec. con núm. de ident.:1 contienen posiciones invariables, *por ejemplo,* posiciones 5, 14, 30, 51 y 55 puede ser Cys solamente. Otras posiciones tales como, por ejemplo, las posiciones 6, 7, 8, 9, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53 y 54 puede ser cualquier aminoácido (que incluye aminoácidos que no son de origen natural). En un ejemplo particularmente preferido, uno o más aminoácidos se corresponden con aquellos de la secuencia nativa (*por ejemplo,* sec. con núm. de ident.:32, ver FIG. 3). En un caso preferido, al menos una posición variable es diferente de la secuencia nativa. En otro caso preferido, los aminoácidos pueden ser cada uno de forma individual o colectivamente sustituido por una sustitución de aminoácido conservadora o no conservadora. Las sustituciones de aminoácidos conservativas sustituyen un aminoácido con otro aminoácido de estructura química similar y puede no tener ningún efecto sobre la función de las proteínas. Las sustituciones de aminoácidos no conservativas sustituyen un aminoácido con otro aminoácido de estructura química diferente. Ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservados incluyen, por ejemplo, Asn->Asp, Arg->Lys y Ser->Thr. En un caso preferido, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,12,13,14,15,16,17,18, 19, 20 y/o 21 de estos aminoácidos puede ser independientemente o colectivamente, en cualquier combinación, seleccionado para que corresponda con la posición correspondiente de la sec. con núm. de ident.:2.

Otras posiciones, por ejemplo, las posiciones 10,11,13,15,16,17,18,19,21,22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 y 45, puede ser cualquiera del conjunto de aminoácidos seleccionado. Por lo tanto, la sec. con núm. de ident.:1 1 define un conjunto de posibles secuencias. Cada miembro de este conjunto contiene, por ejemplo, una cisteína en las posiciones 5, 14, 30, 51 y 55, y uno cualquiera de un conjunto específico de aminoácidos en las posiciones 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 y 45. En un caso preferido, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y/o 19 de estos aminoácidos puede ser independientemente o colectivamente, en cualquier combinación, seleccionado para que corresponda con la posición correspondiente de la sec. con núm. de ident.:2. El péptido de la presente invención tiene al menos 95 % de identidad con la sec. con núm. de ident.:2.

Métodos y Composiciones

La presente invención se dirige además a los métodos para prevenir o reducir la isquemia. En la invención se prefieren los métodos para prevenir o reducir la isquemia o el inicio de una respuesta inflamatoria sistémica (SIR) en un paciente, especialmente asociada con cirugía cardiotorácica. Un método para el tratamiento implica la administración de un polipéptido KI que comprende un dominio Kunitz. Una modalidad del método implica usar un péptido que contiene un secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 1 como se define en las reivindicaciones que tiene una afinidad para la calicreína que es aproximadamente 1000 veces o más que la de una proteasa de serina de amplio intervalo, *por ejemplo,* aprotinina, que se aísla a partir del pulmón bovino y está actualmente aprobada para su uso en los procedimientos de CABG (TRASYLOL®, Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut).

Los pacientes sometidos a cualquiera de una serie de procedimientos quirúrgicos, especialmente los que implican la circulación extracorpórea, *por ejemplo,* cirugía cardiotorácica, tales como, por ejemplo, la CPB, y/o traumatismo óseo, tales como fractura del esternón o reemplazo de la cadera, están en riesgo de la pérdida de sangre perioperatoria e inflamación. El contacto de la sangre de un paciente con las superficies de corte del hueso o el equipo de la CPB es suficiente para activar una o varias respuestas indeseables de la cascada, incluyendo un sistema de activación de contacto (CAS), que puede conducir a la pérdida extensa de sangre perioperatoria que requiere de transfusión sanguínea inmediata, así como una respuesta inflamatoria sistémica (SIR), que, a su vez, puede resultar en daño permanente de tejidos y órganos. Aunque

no se desea estar limitado por cualquier teoría o mecanismo en particular, parece que la pérdida de sangre que se produce asociada con la cirugía cardiotorácica, *por ejemplo,* la CPB, como en un procedimiento de CABG, resulta probablemente de la fuga capilar extensa, que puede resultar en una pérdida significativa de sangre que se debe reemplazar por la transfusión sanguínea inmediata.

Los métodos descritos en la presente invención son útiles para prevenir o reducir varias isquemias incluyendo, por ejemplo, la pérdida de sangre perioperatoria y SIR en un paciente sometido a un procedimiento quirúrgico, y especialmente en donde el procedimiento quirúrgico requiere de la circulación extracorpórea, *por ejemplo,* la cirugía cardiotorácica, tal como, por ejemplo, la CPB. Los métodos de la invención son particularmente útiles para prevenir o reducir pérdida de sangre perioperatoria y/o SIR en un paciente sometido a un procedimiento de CABG que requiere la CPB u otra cirugía cardíaca.

Las composiciones preferidas para uso médico comprenden un polipéptido KI descrito en la presente invención. Tales composiciones útiles pueden comprender además uno o más tampones, portadores, y excipientes, farmacéuticamente aceptables que pueden proporcionar una característica deseable a la composición que incluye pero sin limitarse a, la administración mejorada de la composición a un paciente, media-vida de circulación mejorada del polipéptido KI de la composición, compatibilidad mejorada de la composición con la química sanguínea del paciente, almacenamiento mejorado de la composición, y/o eficacia mejorada de la composición tras la administración a un paciente. Adicionalmente a un polipéptido KI descrito en la presente invención, las composiciones pueden comprender además uno o más compuestos farmacéuticamente activos que proporcionan un beneficio terapéutico o profiláctico adicional a un paciente de un procedimiento quirúrgico invasivo.

Composiciones útiles en los métodos de la presente descripción comprenden cualquiera de los polipéptidos de dominio Kunitz o polipéptidos KI que comprenden tales polipéptidos de dominio Kunitz descritos en la presente invención. Particularmente preferidos son los polipéptidos KI que comprende un polipéptido de dominio Kunitz que tiene una secuencia de 58 aminoácidos de aminoácidos 3-60 de la sec. con núm. de ident.:2. Un ejemplo de tal polipéptido KI particularmente preferido, útil en los métodos y composiciones de la presente descripción es el polipéptido KI PEP-1 que tiene la secuencia de 60 aminoácidos de sec. con núm. de ident.:2. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:2 se proporciona en la sec. con núm. de ident.:3 (ver, *por ejemplo,* nucleótidos 309-488 en la FIG. 2). Se entiende que basado en el código genético conocido, la presente descripción proporciona además las formas degeneradas de la secuencia de nucleótidos de sec. con núm. de ident.:3 por substitución simple de uno o más de los codones degenerados conocidos para cada aminoácido codificado por la secuencia de nucleótidos. Nucleótidos 7-180 de la sec. con núm. de ident.:3, y las formas degeneradas de estos, codifican el polipéptido de dominio Kunitz de origen no natural que tiene la secuencia de 58 aminoácidos de aminoácidos 3-60 de la sec. con núm. de ident.:2.

Cualquiera de una variedad de moléculas de ácido nucleico puede comprender la secuencia nucleotídica de nucleótidos 7-180 de la sec. con núm. de ident.:3, , formas degeneradas, y porciones de estos, que incluyen pero sin limitarse a, los genomas de fago recombinante, vectores recombinantes virales de mamíferos, vectores recombinantes virales de insectos, cromosomas mini levadura, y varios plásmidos. Tales plásmidos incluyen los usados para clonar y/o expresar tales secuencias codificantes de nucleótidos. Los vectores de expresión proporcionan un promotor, que puede estar operablemente enlazado a una secuencia de nucleótidos en particular y una célula huésped adecuada, que es capaz de transcribir la secuencia codificante del nucleótido en particular en un ARN mensajero (ARNm) funcional y traducir además el ARNm en el polipéptido correspondiente. Un polipéptido así producido se puede aislar después de la célula huésped. Las moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio Kunitz o polipéptido KI descritos en la presente invención se pueden elaborar por métodos de síntesis de ácidos nucleicos estándar, metodologías de ADN recombinante, métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y cualquier combinación de éstos.

Pérdida de sangre perioperatoria y flujo sanguíneo cardíaco reducido

Debido a los muchos avances en medicina, un número de procedimientos quirúrgicos altamente invasivos se llevan a cabo cada día que resultan en la pérdida de sangre, o colocan a los pacientes en un alto riesgo de pérdida de sangre. Tales pacientes deben ser cuidadosamente supervisados para restaurar y mantener el suministro normal de la sangre y la hemostasia y pueden necesitar transfusiones de sangre. Los procedimientos quirúrgicos que implican la pérdida de sangre incluyen los que implican los métodos de circulación extracorpórea tal como cirugía cardiotorácica, *por ejemplo,* la CPB. En tales métodos, un corazón de paciente se detiene y la circulación, oxigenación, y mantenimiento del volumen de sangre se llevan a cabo artificialmente mediante un circuito extracorpóreo y un oxigenador de membrana sintético. Estas técnicas se usan comúnmente durante la cirugía cardíaca. Además, es evidente que la cirugía implica el traumatismo extenso del

hueso, tales como la fractura del esternón necesaria en los procedimientos CABG o el reemplazo de cadera, se asocia además con la activación de la CAS, que puede resultar en una variedad de alteraciones en la vasculatura y la sangre.

La enfermedad aterosclerótica de la arteria coronaria (CAD) provoca un estrechamiento del lumen de una o varias de las arterias coronarias; esto limita el flujo de sangre al miocardio (*es decir,* el músculo del corazón) y puede causar angina, insuficiencia cardiaca, e infartos del miocardio. En la etapa final de la ateroesclerosis de la arteria coronaria, la circulación coronaria puede ser casi totalmente ocluida, causando angina o insuficiencia cardíaca potencialmente mortal, con una mortalidad muy alta. Los procedimientos CABG se pueden requerir para llenar el vaso sanguíneo ocluido y restaurar la sangre al corazón; estos son potencialmente salvavidas. Los procedimientos CABG están entre los más invasivos de cirugías en los que una o más venas o arterias sanas se implantan para proporcionar una "derivación coronaria" alrededor de la zona ocluida del vaso enfermo. Los procedimientos CABG portan un riesgo perioperatorio pequeño pero importante, pero son muy exitosos al proporcionar pacientes con alivio inmediato a partir de la morbilidad y mortalidad de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. A pesar de estos resultados muy alentadores, repetir los procedimientos de CABG son frecuentemente necesarios, como se indica por un claro aumento en el número de pacientes que se someten eventualmente a segundos y aun terceros procedimientos; la mortalidad y morbilidad perioperatoria vista en los procedimientos CABG primario se aumenta en estos procedimientos vueltos hacer.

Ha habido mejoras en las técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas para CAD poco complicado. Sin embargo, casi todos los procedimientos de CABG realizados para la enfermedad congénita y/o valvular del corazón, trasplante de corazón, y procedimientos principales aórticos, todavía se llevan a cabo en pacientes apoyados por la CPB. En la CPB, cánulas grandes se insertan en los grandes vasos de un paciente para permitir el bombeo mecánico y oxigenación de la sangre usando un oxigenador de membrana. La sangre se devuelve al paciente sin que fluya a través de los pulmones, que se hipoperfusionan durante este procedimiento. El corazón se detiene usando una solución cardiopléjica, el paciente se enfría para ayudar a prevenir el daño cerebral, y el volumen de circulación periférica aumenta por un circuito extracorpóreo, *es decir,* el circuito de la CPB, que requiere "cebado" con sangre del donador y mezclas salina se usan para llenar el circuito extracorpóreo. La CPB se ha usado extensamente en una variedad de procedimientos realizados durante casi medio siglo con resultados exitosos. La interacción entre superficies artificiales, células de la sangre, proteínas de la sangre, endotelio vascular dañado, y los tejidos extravasculares, tales como hueso, altera la hemostasia y frecuentemente activa el CAS, que, como se señaló anteriormente, puede resultar en una variedad de trastornos en la sangre y vasculatura. Tal trastorno conduce a exceso de sangrado perioperatorio, que requiere después de la transfusión de sangre inmediatamente. Una consecuencia de la circulación de sangre completa a través de un circuito extracorpóreo en la CPB puede incluir además la respuesta inflamatoria sistémica (SIR), que se inicia mediante la activación por contacto de los sistemas de coagulación y complemento. Claramente, mucha de la morbilidad y mortalidad asociada con procedimientos quirúrgicos la CPB exitosos aparentemente de forma mecánica es el resultado de los efectos de la activación de la coagulación, fibrinolisis, o sistemas de complemento. Tal activación puede dañar el sistema pulmonar, que conduce al síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS), debilitación de la circulación esplácnica y del riñón, y la inducción de una coagulopatía general que conduce a la pérdida de la sangre y la necesidad de transfusiones. Adicionalmente a los peligros de la pérdida de sangre perioperatoria, patologías adicionales asociadas con SIR incluyen déficit neurocognitivo, derrame cerebral, insuficiencia renal, infarto agudo de miocardio, y daño del tejido cardíaco.

Las transfusiones de sangre presentan además un riesgo significativo de infección y elevan el costo de CABG u otros procedimientos similares que requieren la CPB. En ausencia de cualquier intervención farmacológica, de tres a siete unidades de sangre típicamente se deben emplear en un paciente, aun con excelentes técnicas quirúrgicas. Como consecuencia, existe incentivo considerable para el desarrollo de compuestos eficaces farmacológicamente nuevos y mejorados para reducir o prevenir el sangrado perioperatorio y SIR en pacientes sometidos a procedimientos de la CPB y el CABG.

Consideraciones para la Administración y Dosificación de polipéptidos KI

Los polipéptidos KI descritos en la presente se pueden administrar a un paciente antes, durante y/o después de un procedimiento quirúrgico en una composición farmacéuticamente aceptable. El término composición "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente o portador no tóxico que se puede administrar a un paciente, junto con un compuesto de la presente descripción, por ejemplo compuestos de la invención, y en donde el excipiente o portador no destruye la actividad farmacológica o biológica de la composición. Los polipéptidos KI descritos en la presente se pueden administrar localmente o sistémicamente por cualquier medio adecuado para el suministro de una cantidad de los polipéptidos KI inhibidores de calicreína a un paciente, que incluyen pero sin limitarse a las administraciones sistémicas tal como, por ejemplo, intravenosa e inhalación. La administración parenteral se prefiere particularmente.

Para la administración parenteral, los polipéptidos se puede inyectar por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o por vía subcutánea. La administración intravenosa se prefiere. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Otros portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse a, agua estéril, solución salina, y solución salina tamponada (que incluye tampones como acetato o fosfato), alcohol, aceites vegetales, glicoles de polietileno, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina, etc. Donde es necesario, la composición puede incluir además un agente de solubilización y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsificantes, sales, lubricantes, etc. siempre y cuando no reaccionen de forma nociva con los compuestos activos. Del mismo modo, la composición puede comprender excipientes convencionales, *por ejemplo,* sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para la aplicación parenteral, enteral o intranasal, que no reaccionan de forma nociva con los compuestos activos. Generalmente, los ingredientes se suministrarán separadamente, o mezclados conjuntamente en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un contenedor herméticamente sellado como un ampolleta o bolsita, indicando la cantidad de agente activo en unidades de actividad. Cuando la composición se administra por infusión, ésta se puede dispensar con una botella de infusión que contiene "agua para inyección" o solución salina grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra por inyección, una ampolleta de agua estéril para inyección o solución salina se puede proporcionar de manera que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

Preferentemente, los métodos de la presente descripción comprenden administrar un polipéptido KI a un paciente como una infusión intravenosa de acuerdo con cualquier procedimiento aprobado. Así, un polipéptido KI descrito en la presente se puede administrar a un paciente sometido a un procedimiento CABG en los tiempos similares a los usados actualmente en los protocolos aprobados para la administración de aprotinina y en una cantidad necesaria para proporcionar un paciente con una concentración o número requerido de unidades inhibidoras de calicreína (KIU). De acuerdo con la presente descripción, un polipéptido KI descrito en la presente se puede administrar a un paciente en el periodo postoperatorio inmediato, cuando anormalidades de sangrado pueden ocurrir como una consecuencia de los efectos corriente abajo de la SIR. Por ejemplo, en un procedimiento que implica la CPB, un polipéptido KI descrito en la presente se puede administrar a un paciente como una dosis de carga inicial, *por ejemplo,* una cantidad eficaz durante el transcurso de un tiempo conveniente, tal como 10 minutos, antes de la inducción de la anestesia. Después, en la inducción de la anestesia, una segunda dosis de polipéptido KI se puede inyectar en el fluido cebador de la CPB ("primer volumen de la bomba"). El paciente se puede colocar después en una dosis de infusión intravenosa continua y controlada durante el procedimiento quirúrgico, y después del procedimiento si se indica.

En la actualidad existen dos regímenes aprobados en los Estados Unidos para administrar la aprotinina a un paciente que se somete a un procedimiento CABG (ver, etiqueta e inserto del producto de TRASYLUL®, Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut). Un régimen aprobado de ese tipo usa una dosis de carga intravenosa de 2 millones KIU, 2 millones KIU en el primer volumen de la bomba, y 500,000 KIU por hora de la cirugía. Otro régimen aprobado usa dosis de carga intravenosa de 1 millón KIU, 1 millón KIU en el primer volumen de la bomba, y 250,000 KIU por hora de cirugía. Como estos regímenes se basan en KIU, los regímenes se adaptan fácilmente a cualquier polipéptido KI descrito en la presente una vez que la actividad específica y KIU de un polipéptido particular KI se ha determinado por análisis estándar. Debido a la actividad inhibitoria y afinidad de unión mejorada en los polipéptidos KI representativos descritos en la presente en relación con la aprotinina, se espera que tales métodos y composiciones de la presente descripción son probables requieran menos miligramos (mg) por paciente para proporcionar un paciente con la concentración o número de KIU requerido.

Varias consideraciones con respecto a la dosificación con un polipéptido KI en los métodos de la presente descripción se pueden ilustrar a modo de ejemplo con el polipéptido KI de la invención representativo PEP-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:2 (peso molecular de 7,054 Daltons).

La tabla 1, más abajo, proporciona una comparación de la afinidad ($K_{i,app}$) del polipéptido KI PEP-1 para calicreína y otras once proteasas de plasma conocidas

Tabla 1

Sustrato de proteasa	PEP-1 $K_{i,app}$(pM)	Aprotinina $K_{i,app}$(pM)
calicreína plasmática humana	44	3.0×10^4
calicreína de la orina humana	$>1 \times 10^8$	4.0×10^3
calicreína pancreática porcina	2.7×10^7	550
Clr humana, activada	$>2.0 \times 10^8$	$>1.0 \times 10^7$
Cls humana, activada	$>2.0 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^8$
factor de plasma humano XIa	1.0×10^4	ND
factor de plasma humano XIIa	$>2.0 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^8$
plasmina humana	1.4×10^5	894
tripsina pancreática humana	$>2 \times 10^7$	ND
quimotripsina pancreática humana	$>2.0 \times 10^7$	7.3×10^5
elastasa de neutrófilos humana	$>2.0 \times 10^7$	1.7×10^6
trombina plasmática humana	$>2.0 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^8$

ND = no determinado

Claramente, el polipéptido KI PEP-1 es altamente específico para la calicreína plasmática humana. Además, la afinidad ($K_{i,app}$) de PEP-1 para calicreína es 1000 veces mayor que la afinidad de aprotinina para calicreína: la $K_{i,app}$ de PEP-1 para calicreína es aproximadamente 44 pM (Tabla 1), mientras que la $K_{i,app}$ de aprotinina para calicreína es 30,000 pM. Así, una dosis de PEP-1 puede ser aproximadamente 1000 veces más baja que la usada para la aprotinina en una base por mol. Sin embargo, la consideración de otros varios factores puede proporcionar una estimación más exacta de la dosis de PEP-1 requerida en la práctica. Tales factores incluyen la cantidad de calicreína activada durante la CPB en un paciente particular, la concentración de calicreína requerida para provocar una SIR, y la biodisponibilidad y distribución farmacológica de PBP-1 en un paciente. No obstante, el uso de un polipéptido KI en los métodos de acuerdo con la presente descripción y proporcionados en las dosis actualmente aprobadas para el uso de aprotinina se espera todavía que proporcione mejoras significativas en el uso actual de la aprotinina bovina de afinidad inferior, menos específica.

Por ejemplo, la cantidad total de precalicreína circulante en plasma se estima en aproximadamente 500 nM (Silverberg, M. y otros, "The Contact System y Its Disorders," en Blood: Principles y Practice of Hematology, Handin, R. y otros, eds., JB Lippincott Co., Filadelfia, 1995). Si todas las precalicreína se activaron, después al menos 500 nM de PEP-1 se puede requerir para una inhibición estequiométrica de calicreína. Un individuo que tiene 5 litros de plasma por lo tanto puede requerir aproximadamente 18 mg de PEP-1 para alcanzar una concentración plasmática de 500 nM.

Otro factor a considerar es la concentración umbral de calicreína requerida para inducir una SIR en un paciente. Si la concentración de calicreína activa se debe mantener más abajo de, *por ejemplo*, 1 nM, después debido a su alta afinidad por la calicreína, PEP-1 ofrece una ventaja significativa sobre la aprotinina en la cantidad de proteína que se puede requerir para inhibir la SIR. Particularmente, una concentración de PEP-1 de 1nM puede inhibir el 99.6% de calicreína presente en 1 nM (*es decir*, sólo 0.4 pM de calicreína libre que permanece en la sangre), mientras que una concentración de aprotinina de 1 nM sólo puede inhibir el 24.5 % de la calicreína presente en 1 nM. Para la aprotinina inhibir el 99 % de la calicreína en 1 nM, una concentración de aprotinina en el plasma de al menos 3 µM se requiere (*es decir*, 3000 veces mayor concentración que PEP-1).

Para un paciente que se somete a CPB, una dosis clínica inicial de PEP-1 se puede estimar de un régimen de dosis recomendado de aprotinina (1 x 10^6 KIU) mencionada anteriormente. La aprotinina se reporta en un prospecto que tiene como actividad inhibidora específica de 7143 KIU/mg determinado usando un análisis de la presión sanguínea de perro. Por lo tanto, 1 x 10^6 KIU de aprotinina es equivalente a 140 mg de aprotinina (*es decir*, 1 x 10^6 KIU/7143 KIU/mg = 140 mg de aprotinina). En un paciente que tiene un volumen de plasma sanguíneo de 5 litros, 140 mg corresponden a aproximadamente 4.3 µM de aprotinina (el peso molecular de aprotinina es 6512 Daltons). La actividad específica de aprotinina en el ensayo inhibidor estándar usado para PEP-1 es 0.4 KIU/mg del polipéptido. Una dosis de 140 mg puede corresponder a una dosis de carga de aprotinina de 56 KIU (140 mg x 0.4 KIU/mg = 56 KIU). En contraste, ya que la actividad específica del polipéptido KI PEP-1 es 10 KIU/mg en el ensayo de inhibición estándar, una dosis de sólo 5.6 mg de PEP-1 se puede requerir para proporcionar el número de KIUs equivalentes para 140 mg de aprotinina. En un paciente con un volumen de plasma de 5 litros, esto corresponde a aproximadamente 160 nM de PEP-1 (el peso molecular de PEP-1 es 7054 Daltons), aunque una dosis superior del polipéptido KI PEP-1 se puede requerir si toda la calicreína plasmática (500 nM) se activa o si este polipéptido KI se distribuye mal en un paciente.

Además, los polipéptidos KI pueden ser de origen no-natural, y se pueden producir sintéticamente o por vía recombinante, como se señaló anteriormente, evitando de ese modo la contaminación potencial de enfermedades transmisibles que pueden surgir durante el aislamiento de una proteína de fuente natural animal, tal como en el caso de aprotinina, que se aísla de pulmón bovino. Cada vez más importante para la aceptación pública y administrativa de una composición farmacéutica o tratamiento que comprende un polipéptido es la evasión de la posible contaminación con y la transmisión a pacientes humanos de varios agentes patológicos. De particular interés para la seguridad de las proteínas aisladas de un tejido bovino es la eliminación del posible riesgo de exposición a enfermedades mediadas por virus, enfermedades mediadas por bacterias y, especialmente, las encefalopatías espongiformes bovinas.

Como variantes del dominio 1 de Kunitz de la proteína LACI humana, se esperan menos efectos secundarios a partir de administrar los polipéptidos KI a los pacientes que para la aprotinina, la cual es una proteína bovina que se documenta que causa respuestas anafilácticas y anafilactoides en los pacientes, especialmente al repetir las administraciones, tal como procedimientos de CABG por segunda vez. Además, la unión altamente específica de los polipéptidos KI a la calicreína descrita en la presente limitará eficazmente o eliminará las tendencias trombóticas observadas con la aprotinina, y reducirá los problemas observados con la ambigüedad patente del injerto a continuación de los procedimientos de CABG.

La invención será descrita además con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplificación

Ejemplo 1: Un polipéptido KI representativo.

Un polipéptido KI (PEP-1) de origen no natural, útil en las composiciones y métodos de la presente descripción se identificó como un polipéptido de unión a calicreína que aparece en un fago recombinante a partir de una genoteca de presentación de fago. PEP-1 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Thr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (sec. con núm. de ident.:2). El peso molecular de PEP-1 es 7,054 Daltons.

La secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident.:3) del ADN del fago recombinante que codifica la secuencia de aminoácidos PEP-1 (sec. con núm. de ident.:2) se aisló y se secuenció por métodos estándar determinados a partir del ADN del fago recombinante. PEP-1 se produjo en cantidades útiles para la caracterización adicional como una proteína recombinante en las células huésped de fenotipo *His4*$^-$ de la cepa de levadura *Pichia pastoris.*

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

El plásmido inicial, pHIL-D2, es resistente a la ampicilina y contiene un alelo silvestre de *His4* a partir de *P. pastoris.* La secuencia final del ADN que comprende la secuencia codificante para la proteína de fusión matα Prepro-PEP-1 en el plásmido de expresión recombinante pPIC-K503 se muestra en la Figura 2. La secuencia de ADN de pHIL-D2 se modificó para producir pPIC-K503, como sigue:

1. El sitio *Bst*BI en la región 3' AOX1 de pHIL-D2, situado corriente abajo del gen *His4*, se eliminó por la digestión de restricción parcial, relleno, y ligación, alterando la secuencia de TTCGAA (sec. con núm. de ident.:23) a

TTCGCGAA (sec. con núm. de ident.:24). Esta modificación se hizo para facilitar y dirigir la clonación del casete de expresión en el plásmido.

2. El sitio *Aat*II que comprende el gen *bla* situado corriente abajo de*His4* se eliminó por digestión de restricción, relleno y ligación modificando la secuencia de GACGTC (sec. con núm. de ident.:25) a GACGTACGTC (sec. con núm. de ident.:26). Esta modificación se hizo para facilitar la clonación de los casetes de expresión que tienen sitios *Aat*II en el plásmido. El ADN que codifica PEP-1 se sintetizó basado en la secuencia de nucleótido a partir del fago de la presentación que se une a la calicreína original y consistió en 450 pares de bases (pb). La secuencia del ADN final del inserto en el plásmido pHIL-D2 se flanquea por una secuencia 5' AOX1 y una secuencia 3' AOX1 (cuyas porciones se muestran en la Figura. 2) y codifica una proteína de fusión que comprende el péptido señal matα prepro de *S. cerevisiae* fusionado a la secuencia codificante estructural del polipéptido KI PEP-1. El péptido señal se añadió para facilitar la secreción de PEP-1 de las células huésped de levadura. Los oligonucleótidos para formar el inserto se sintetizaron y obtuvieron comercialmente (Génesis Labs, The Woodlands, TX), y el inserto se generó por la reacción en cadena de polimerasa (PCR). El ADN sintético unido que codifica la proteína de fusión matα prepro/PEP-1 se incorporó después por la ligación en el plásmido pHIL-D2 modificado entre los sitios *Bst*BI y *Eco*RI.

Los productos de la ligación se usaron para transformar la cepa *Escherichia coli* XL1 Blue. Un análisis PCR se usó para tamizar los transformantes de *E. coli* para el constructo de plásmido deseado. El ADN de extractos celulares se amplificó por PCR usando iniciadores que contienen las secuencias 5' AOX1 y 3' AOX1 (ver anteriormente y la Figura 2). Los productos de la PCR de número correcto de pares de bases se secuenciaron. Adicionalmente, aproximadamente 20-50 pb a ambos lados de los sitios de clonación se secuenciaron y se obtuvo la secuencia prevista. La secuencia de ADN final del inserto en el plásmido pHIL-D2 (para obtener el plásmido pPIC-K503) se muestra en la Figura 2 junto con las porciones de las secuencias de flanqueo 5' y 3' AOX1 y secuencia de aminoácidos correspondiente de la proteína de fusión que comprende el péptido señal matα prepro de *S. cerevisiae* fusionado a la secuencia codificante estructural del polipéptido KI PEP-1. Un transformante con el constructo de plásmido de expresión deseado, plásmido pPIC-K503, se seleccionó para preparar las líneas celulares de levadura para la producción rutinaria de PEP-1.

Ejemplo 3: Fabricación de PEP-1 a partir de la línea celular de levadura recombinante.

Esferoplastos de *P. pastoris* GS 115 que tienen el fenotipo *His4*$^-$ se transformaron con el plásmido de expresión pPIC-K503 (anteriormente) a continuación de la linearización del plásmido en el sitio *Sac*I y recombinación homóloga del plásmido ADN en el locus huésped 5' AOX1. El fenotipo de la cepa de producción es *His4*$^+$. El plásmido entero se insertó en la secuencia genómica 5' AOX1 de la levadura.

Los aislados de la transformación se tamizaron para el crecimiento en ausencia de histidina exógena con metanol como única fuente de carbono. Mayor de 95 % de los transformantes retuvo la capacidad silvestre de crecer con metanol como única fuente de carbono, demostrando de ese modo que el plásmido había sido insertado en el genoma del huésped por recombinación homóloga en lugar de inserción por desplazamiento. Estos transformantes no requirieron histidina exógena para el crecimiento, demostrando de ese modo que el plásmido se había integrado en el genoma del huésped. Las colonias seleccionadas se clonaron. Estudios de expresión en cultivos pequeños se realizaron para identificar los clones que secretan los niveles más altos de PEP-1 activo en el medio de cultivo. Los niveles de secreción de PEP-1 en soluciones de sobrenadante de cultivo clarificados se cuantificaron para los niveles de PEP-1 por electroforesis del gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) y evaluaron para la inhibición de la calicreína. Un clon de levadura se seleccionó para la producción de PEP-1 basado en su alto nivel de expresión de PEP-1 entre los cultivos muestreados.

Los bancos de células maestro y trabajo de *P. pastoris* que producen PEP-1 se prepararon comercialmente (MDS Pharma Services, Bothell, Washington). Una producción estándar de PEP-1 en la levadura comprende tres etapas como sigue: (1) preparación del cultivo semilla, (2) fermentación, y (3) recuperación del cultivo.

La etapa del cultivo semilla consiste en la inoculación de seis frascos (300 ml cada uno) que contienen el caldo del inóculo estéril (levadura con base de nitrógeno, fosfato de potasio, y glicerol, pH = 5) con el contenido de un solo vial de un banco de trabajo de *P. pastoris* que produce PEP-1. Los frascos se inocularon en un agitador orbital (300 rpm) durante aproximadamente 13 horas a 30 °C ± 2 °C.

Las fermentaciones se realizaron en un fermentador Braun cerrado de 100 litros lleno con caldo estéril. Cada fermentación se inició con la transferencia del contenido de los seis frascos de cultivo semilla al fermentador. Después de aproximadamente 24 horas, el glicerol en el fermentador se agotó y se añadió glicerol adicional por aproximadamente 8 horas adicionales.

Se inició después una fase de alimentación mixta, que duró aproximadamente 83 horas, mediante la adición de una alimentación de glicerol y metanol. Al final de este tiempo, la fermentación se terminó, y los contenidos del fermentador se diluyeron con agua purificada. La purificación y procesamiento de PEP-1 consistió en cinco etapas como sigue: (1) cromatografía de lecho expandido, (2) cromatografía de intercambio de cationes, (3) cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), (4), ultrafiltración y diafiltración, y (5) filtración final y empaque.

La etapa de purificación inicial consistió en la cromatografía de lecho expandido. El cultivo del fermentador diluido se aplicó a la columna equilibrada empacada con resina Streamline SP (columna de cromatografía Amersham Pharmacia Streamline 200, Amersham Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey). Después se lavó la columna (50 mM ácido acético, pH = 3.0-3.5) en un modo de flujo ascendente para eliminar las células de levadura del lecho expandido. El adaptador superior se levantó por encima de la cama expandida para mejorar el lavado. El flujo se detuvo y el lecho se le permitió asentar. El adaptador se movió hacia abajo de manera que fue ligeramente por encima del lecho asentado. La dirección del flujo se invirtió. Se recogió el efluente. El lavado se continuó en un modo descendente usando 50 mM acetato de sodio, pH 4.0. Se recogió el efluente. PEP-1 se eluyó de la columna usando 50 mM acetato de sodio, pH 6.0. El efluente se recogió en un recipiente de 50 litros. El eluato se filtró después a través de un filtro de 0.22 µ en un recipiente limpio situado en el sitio de purificación. Se recogieron muestras adicionales para la determinación de la concentración de PEP-1. Una etapa de cromatografía de intercambio de cationes se realiza después usando el eluato filtrado de la columna de lecho expandido. PEP-1 se eluyó de la columna usando 15 mM citrato trisódico, pH 6.2.

Las proteínas adicionales se eliminaron de la preparación de PEP-1 por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). Antes de HIC, el eluato de la columna de intercambio de cationes se diluyó con sulfato amónico. El eluato se aplicó a la columna, y el PEP-1 se eluyó con sulfato amónico (0.572 M) en fosfato de potasio (100 mM), pH 7.0. El eluato se colectó en fracciones basado en los valores A280. Todas las fracciones se recogieron en botellas PETG estériles, previamente pesadas.

Las fracciones seleccionadas se mezclaron en un recipiente limpio. La mezcla se concentró por ultrafiltración. La preparación concentrada de PEP-1 se diafiltró inmediatamente contra diez volúmenes de PBS, pH 7.0.

Una etapa de filtración final se realizó antes del empaque para minimizar la carga microbiana en el PEP-1 a granel. La solución a granel se filtró a través de un filtro de 0.22 µ y recogió en una botella PETG estéril, previamente pesada. Una muestra se extrajo para muchas pruebas de liberación. El resto del granel se dispensó asépticamente en botellas PETG estériles y almacenó a -20 °C.

Ejemplo 4: Ensayo de Inhibición de Calicreína.

Una prueba cinética se usó para medir la actividad inhibidora de los polipéptidos KI, tal como PEP-1. El ensayo cinético mide la fluorescencia a continuación de la escisión mediada por calicreína de un sustrato, prolilfenilalanilarginil amino metil cumarina. Una cantidad conocida de calicreína se incubó con un estándar de referencia del polipéptido KI diluido en serie o muestras de prueba del polipéptido KI diluidas en serie, en un tampón de reacción adecuado en una placa de microtitulación. Cada muestra se corrió por triplicado. La solución sustrato se añadió, y la placa se leyó inmediatamente usando una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Al menos dos de cada una de las curvas del estándar de referencia y muestra se requirieron para tener un valor de R cuadrado de 0.95 que se considera válido.

Reivindicaciones

1. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos: Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (sec. con núm. de ident.:1), en donde
Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 o Xaa58 son cada uno individualmente un aminoácido o está ausente;
Xaa10 es Asp;
Xaa11 es Asp;
Xaa13 es Pro;
Xaa15 es Arg;
Xaa16 es Ala;
Xaa17 es Ala;
Xaa18 es His;
Xaa19 es Pro;
Xaa21 es Trp;
Xaa22 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Tyr y Phe;
Xaa23 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Tyr y Phe;
Xaa31 es Glu;
Xaa32 es Glu;
Xaa34 es Ile;
Xaa35 es Tyr;
Xaa39 es Glu;
Xaa40 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly y Ala;
Xaa43 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gly;
Xaa45 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Phe y Tyr; y
en donde el polipéptido inhibe la calicreína.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos: Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 5-60 de la sec. con núm. de ident.:2).

3. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de aminoácido tiene al menos 95% de identidad a la sec. con núm. de ident.: 2.

4. Un polipéptido que comprende una porción de la secuencia de aminoácidos que se menciona en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha porción se une a calicreína.

5. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para usar en la prevención o reducción de la isquemia en un paciente, o para usar en la prevención o reducción del inicio de una respuesta inflamatoria sistémica asociada con un procedimiento quirúrgico en un paciente.

6. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

7. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6.

8. El polipéptido de la reivindicación 5, en donde el procedimiento quirúrgico es cirugía cardiotorácica.

9. El polipéptido de la reivindicación 5, en donde el procedimiento quirúrgico es injerto de derivación de la arteria coronaria.

10. El polipéptido de la reivindicación 5, en donde el procedimiento quirúrgico es derivación cardiopulmonar.

11. El polipéptido de la reivindicación 5, en donde el procedimiento quirúrgico es un reemplazo de cadera o una fractura del esternón.

Figura 1

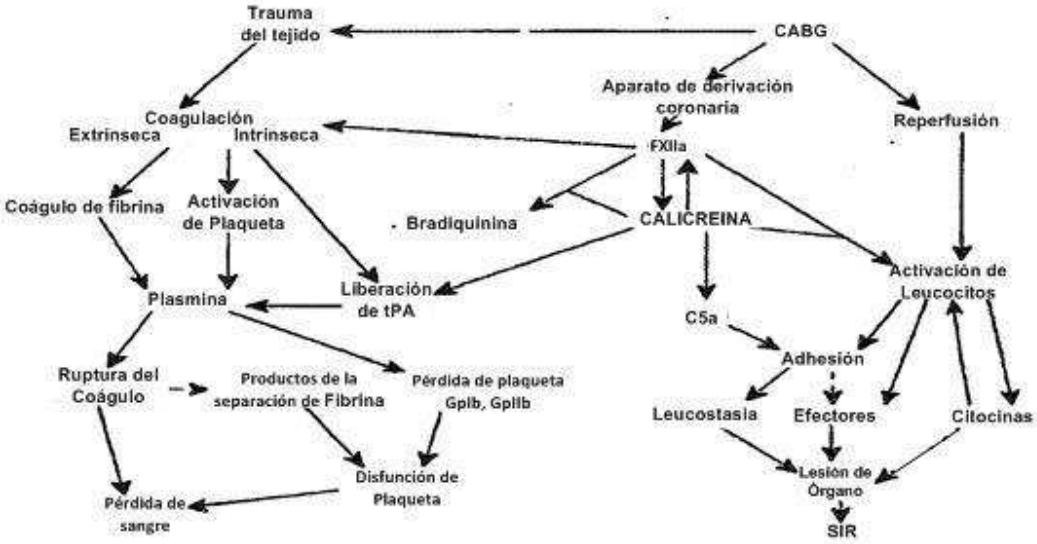

Trauma del tejido
CABG
Aparato de derivación coronaria
Reperfusión
Coagulación
Extrínseca
Intrínseca
FXIIa
Coágulo de fibrina
Activación de Plaqueta
Bradiquinina
CALICREINA
Activación de Leucocitos
Plasmina
Liberación de tPA
C5a
Adhesión
Ruptura del Coágulo
Productos de la separación de Fibrina
Pérdida de plaqueta GpIb, GpIIb
Leucostasia
Efectores
Citocinas
Disfunción de Plaqueta
Lesión de Órgano
Pérdida de sangre
SIR

Figura 2

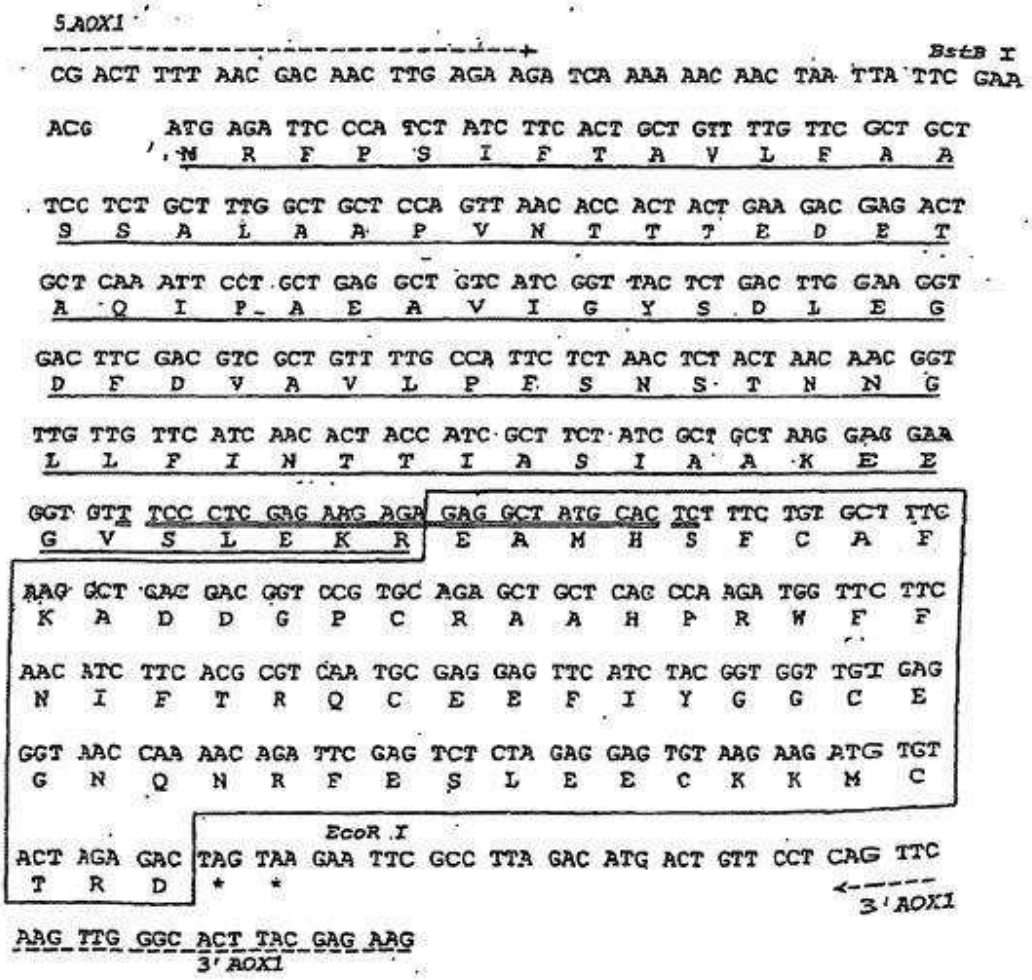
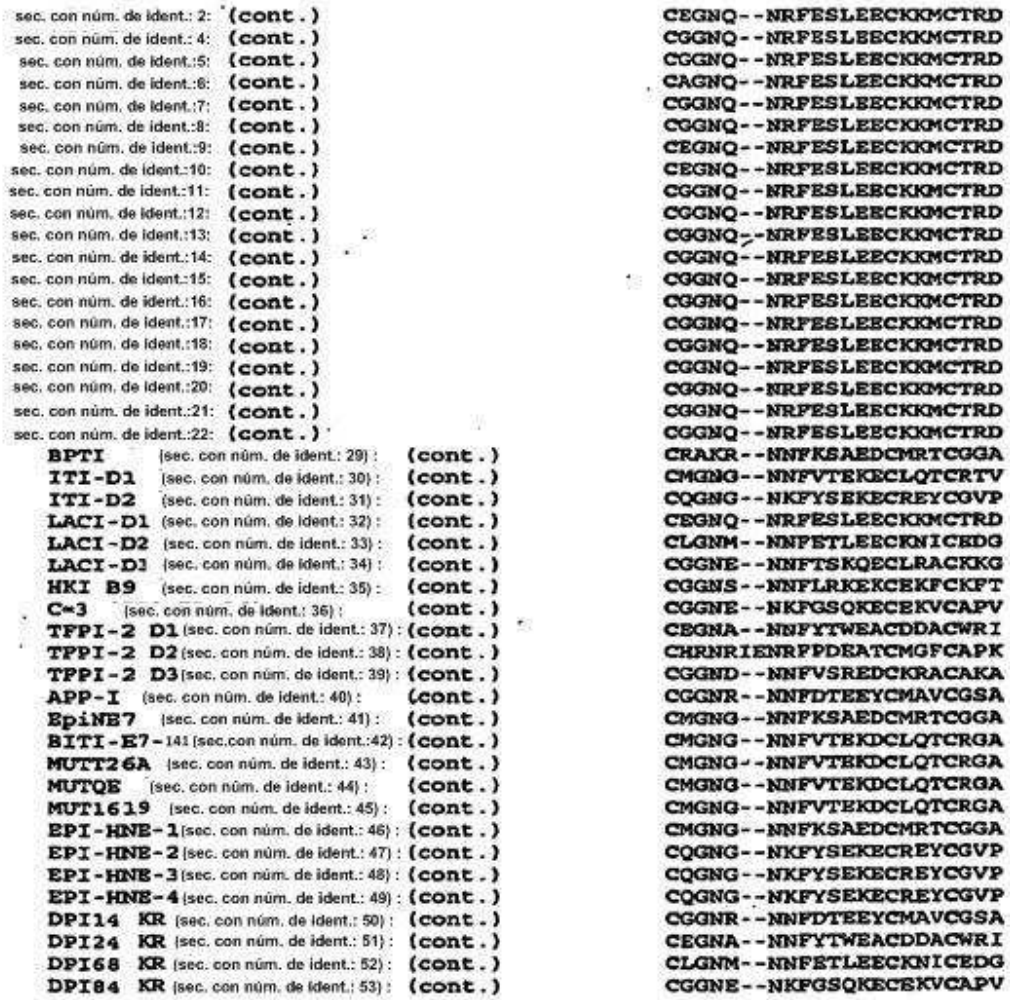

5'AOX1
BstB I
CG ACT TTT AAC GAC AAC TTG AGA AGA TCA AAA AAC AAC TAA TTA TTC GAA
ACG ATG AGA TTC CCA TCT ATC TTC ACT GCT GTT TTG TTC GCT GCT
M R F P S I F T A V L F A A
TCC TCT GCT TTG GCT GCT CCA GTT AAC ACC ACT ACT GAA GAC GAG ACT
S S A L A A P V N T T T E D E T
GCT CAA ATT CCT GCT GAG GCT GTC ATC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

Figura 3A

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

Figura 3B


sec. con núm. de ident.: 2: (cont.) CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.: 4: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:5: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:6: (cont.) CAGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:7: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:8: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:9: (cont.) CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:10: (cont.) CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:11: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:12: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:13: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:14: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:15: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:16: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:17: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:18: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:19: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:20: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:21: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
sec. con núm. de ident.:22: (cont.) CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
BPTI (sec. con núm. de ident.: 29) : (cont.) CRAKR--NNFKSAEDCMRTCGGA
ITI-D1 (sec. con núm. de ident.: 30) : (cont.) CMGNG--NNFVTEKECLQTCRTV
ITI-D2 (sec. con núm. de ident.: 31) : (cont.) CQGNG--NKFYSEKECREYCGVP
LACI-D1 (sec. con núm. de ident.: 32) : (cont.) CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
LACI-D2 (sec. con núm. de ident.: 33) : (cont.) CLGNM--NNFETLEECKNICEDG
LACI-D3 (sec. con núm. de ident.: 34) : (cont.) CGGNE--NNFTSKQECLRACKKG
HKI B9 (sec. con núm. de ident.: 35) : (cont.) CGGNS--NNFLRKEKCEKFCKFT
C3 (sec. con núm. de ident.: 36) : (cont.) CGGNE--NKFGSQKECEKVCAPV
TFPI-2 D1 (sec. con núm. de ident.: 37) : (cont.) CEGNA--NNFYTWEACDDACWRI
TFPI-2 D2 (sec. con núm. de ident.: 38) : (cont.) CHRNRIENRFPDEATCMGFCAPK
TFPI-2 D3 (sec. con núm. de ident.: 39) : (cont.) CGGND--NNFVSREDCKRACAKA
APP-I (sec. con núm. de ident.: 40) : (cont.) CGGNR--NNFDTEEYCMAVCGSA
EpiNE7 (sec. con núm. de ident.: 41) : (cont.) CMGNG--NNFKSAEDCMRTCGGA
BITI-E7-141 (sec.con núm. de ident.:42) : (cont.) CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
MUTT26A (sec. con núm. de ident.: 43) : (cont.) CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
MUTQE (sec. con núm. de ident.: 44) : (cont.) CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
MUT1619 (sec. con núm. de ident.: 45) : (cont.) CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
EPI-HNE-1 (sec. con núm. de ident.: 46) : (cont.) CMGNG--NNFKSAEDCMRTCGGA
EPI-HNE-2 (sec. con núm. de ident.: 47) : (cont.) CQGNG--NKFYSEKECREYCGVP
EPI-HNE-3 (sec. con núm. de ident.: 48) : (cont.) CQGNG--NKPYSEKECREYCGVP
EPI-HNE-4 (sec. con núm. de ident.: 49) : (cont.) CQGNG--NKFYSEKECREYCGVP
DPI14 KR (sec. con núm. de ident.: 50) : (cont.) CGGNR--NNFDTEEYCMAVCGSA
DPI24 KR (sec. con núm. de ident.: 51) : (cont.) CEGNA--NNFYTWEACDDACWRI
DPI68 KR (sec. con núm. de ident.: 52) : (cont.) CLGNM--NNFETLEECKNICEDG
DPI84 KR (sec. con núm. de ident.: 53) : (cont.) CGGNE--NKPGSQKECEKVCAPV