

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 832**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2015.01)

**A61K 35/14** (2015.01)

**A61K 38/57** (2006.01)

**C12N 5/0787** (2010.01)

**C12Q 1/37** (2006.01)

**A61P 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2010 E 10710673 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2405925**

54 Título: **Uso de inhibidores de serina proteasa en el tratamiento de la neutropenia**

30 Prioridad:

**10.03.2009 US 202535**

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

**29.04.2015**

73 Titular/es:

**MED DISCOVERY SA (50.0%)  
Route de Pré-Bois 29  
1216 Coltrin/Geneva, CH y  
UNIVERSITY OF ZURICH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FONTANA, ADRIANO;  
RECHER, MIKE y  
KUNDIG, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

ES 2 534 832 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

Uso de inhibidores de serina proteasa en el tratamiento de la neutropenia

Campo de la invención

5 La invención se refiere a los compuestos terapéuticos que son inhibidores de serina proteasa, a composiciones farmacéuticas de los mismos y a su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal. Más específicamente, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de la neutropenia que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de serina proteasa a un sujeto que lo necesita. La invención comprende además la prevención de apoptosis de las células mieloides (1) durante y después de la transfeción de células de la médula ósea realizada para la terapia génica, (2) durante la movilización de células madre sanguíneas realizada para la reconstitución de la hematopoyesis y (3) durante la infusión de células del linaje mieloides para la reconstitución de la hematopoyesis en la terapia génica o para el tratamiento de la neutropenia por la infusión de neutrófilos.

Antecedentes de la invención

15 La invención se refiere al uso de compuestos que son inhibidores de serina proteasa.

20 Las proteasas o enzimas proteolíticas son esenciales en los organismos, desde las bacterias y virus hasta los mamíferos. Las proteasas digieren y degradan las proteínas mediante la hidrólisis de enlaces peptídicos. Las serina proteasa (EC. 3.4.21) tienen características comunes en el sitio activo, principalmente un residuo serina activo. Hay dos tipos principales de serina proteasas: tipo-quimiotripsina tripsina elastasa y tipo subtilisina, que tienen una disposición espacial idéntica de His, Asp, y Ser catalíticas pero en estructuras proteicas muy diferentes. Sin embargo, se han identificado más de veinte familias (S1-S27) de serina proteasas que se agrupan en 6 clanes basado en la similitud estructural y otras evidencias funcionales, SA, SB, SC, SE, SF & SG. La familia de serina proteasas tipo quimiotripsina/tripsina elastasa se ha subdividido en dos clases. La clase "grande" (aprox. 230 residuos) incluye principalmente enzimas de mamíferos tales como la tripsina, quimiotripsina, elastasa, calicreína, y trombina. La clase "pequeña" (aprox. 190 residuos) incluye las enzimas bacterianas.

30 Los sitios catalíticos His, Asp y Ser son flanqueados por bolsillos de unión al residuo de la cadena lateral de aminoácidos del sustrato denominado S1', S2', S3' etc en el C-terminal o lado 'iniciador' del sustrato y S1, S2, S3, etc en el lado N-terminal. Esta nomenclatura es como se describió en Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding, Alan Fersht, 1999 (W.H. Freeman and Company) págs 40-43 y Brik y otros, Org. Biomol. Chem., 2003, 1, 5-14. Las serina proteasas tipo quimiotripsina/tripsina/elastasa se pueden subdividir además por los residuos presentes en el bolsillo S1 como se describe en la introducción de Protein Structure, Carl Brand and John Tooze. 1991 (Garland Publishing Inc) págs 231- 241. Las subdivisiones son tipo quimiotripsina (Gly-226, Ser-189 y Gly- 216 en el bolsillo S1), tipo tripsina (Gly-226, Asp 189 y Gly-216 en S1) y tipo elastasa (Val-226 y Thr-216 en S1), donde la numeración de los residuos se toma de la numeración estándar de la quimiotripsina. Las serina proteasa de tipo tripsina prefieren los sustratos que colocan ya sea Lys o Arg en el bolsillo S1.

40 Las serina proteasas tienen un mecanismo catalítico común caracterizado por un residuo Ser particularmente reactivo en la posición 195 usando el sistema de numeración de la quimiotripsina. Los ejemplos de serina proteasa incluyen tripsina, triptasa, quimiotripsina, elastasa, trombina, plasmina, calicreína. Proteasa acrosomal del complemento CL, proteasa lisosomal, coonasa, proteasa  $\alpha$ -lítica, proteasa A, proteasa B, serina carboxipeptidasa  $\pi$ , subtilisina, uroquinasa (uPA), Factor VIIa, Factor IXa, y Factor Xa. Las serina proteasas se han investigado ampliamente durante muchos años y son el principal enfoque de investigación como un objetivo de fármaco debido a su papel en la regulación de una amplia variedad de procesos fisiológicos.

45 Los procesos que involucran las serina proteasa incluyen coagulación, fibrinólisis, fertilización, desarrollo, malignidad, patrón neuromuscular e inflamación, es bien conocido que estos compuestos inhiben una variedad de proteasas en circulación, así como proteasas que se activan o liberan en los tejidos. Se sabe además que los inhibidores de serina proteasa inhiben procesos celulares críticos, como la adhesión, migración, producción de radicales libres y apoptosis. Adicionalmente, los experimentos con animales indican que inhibidores de serina proteasa administrados por vía intravenosa, variantes o células que expresan inhibidores de serina proteasa, proporcionan protección contra el daño tisular.

55 Se predice además que los inhibidores de serina proteasa tienen usos beneficiosos potenciales en el tratamiento de enfermedades en una amplia variedad de áreas clínicas tales como oncología, hematología, neurología, medicina pulmonar,

5 inmunología, inflamación y enfermedades infecciosas. Los inhibidores de serina proteasa pueden ser beneficiosos además en el tratamiento de enfermedades trombóticas, asma, enfisema, cirrosis, artritis, carcinoma, melanoma, reestenosis, ateroma, traumatismo, shock y lesión por reperfusión. Una revisión útil se encuentra en "Expert Opin. Ther. Patents (2002), 12(8). Los inhibidores de serina proteasa se describen en solicitudes de patente de Estados Unidos publicadas US 2003/0100089 y 2004/0180371 y en las patentes de Estados Unidos 6,784,182, 6,656,911, 6,656,910, 6,608,175, 6,534,495 y 6,472,393.

10 La leucopenia se refiere a una disminución en el recuento total de leucocitos por debajo de aproximadamente  $4.0 \times 10^9$  células/L. Por lo general, la reducción es el resultado de una disminución en el número de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) (neutropenia), sus números por lo general son menores que  $2.0 \times 10^9$  células/L y con frecuencia por debajo de  $1.0 \times 10^9$  células/L. La neutropenia puede resultar de infecciones virales (por ejemplo, gripe, sarampión, virus de la hepatitis, varicela, dengue y fiebre amarilla, VIH) o de infecciones bacterianas abrumadoras incluyendo la tuberculosis miliar y la septicemia. Además, la neutropenia se desarrolla debido a la irradiación o el tratamiento con los fármacos usados por ejemplo, en la quimioterapia de enfermedades malignas o vasculitis y enfermedades autoinmunes. Ejemplos de neutropenia 15 inducida por fármacos son las sulfonamidas, fármacos antitiroideos, antihistamínicos, agentes antimicrobianos, fenotiazinas y varios analgésicos, sedantes y agentes anti-inflamatorios o varios productos químicos tóxicos. La inducción de la muerte celular por agentes infecciosos, fármacos y productos químicos tóxicos o anticuerpos puede afectar a los neutrófilos y/o sus células precursoras en la médula ósea. Se observan anticuerpos de las células de linaje mieloide en las enfermedades mediadas por el sistema inmune tales como lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide juvenil. Por último, se han descrito varias formas de neutropenia congénita. La neutropenia resulta no sólo del daño de los PMN en la circulación, sino también del daño de las células madre y células mitóticas en la médula ósea por agentes infecciosos, fármacos, irradiación y productos químicos tóxicos o debido a la desaceleración de las divisiones celulares, el bloqueo de la duplicación de la cadena del ADN, la formación del ARN o alteración de los microtúbulos del huso mitótico.

25 La neutropenia por ejemplo debido a la quimioterapia por malignidades hematológicas, tumores sólidos o carcinomas conduce a una respuesta del huésped deteriorada con significativa morbilidad y mortalidad debido a infecciones. Por ejemplo la quimioterapia del cáncer de mama temprano con ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo resulta en eventos neutropénicos, en el 30% de los pacientes con sepsis con necesidad de retardo del tratamiento adicional contra el cáncer o la reducción de la dosis. Reducciones del 20-30% de las dosis se asociaron con tasas de respuesta completas inferiores y acortaron la supervivencia en pacientes con linfoma o con la supervivencia inferior libre de recaída. A pesar de las mejoras en el tratamiento antibacteriano para la sepsis neutropénica, cada año aproximadamente 5% de los pacientes que reciben quimioterapia mielotóxica mueren debido a las complicaciones relacionadas con la infección.

30 El manejo in vitro de neutrófilos y sus células precursoras por ejemplo, para la terapia génica o para la preparación de infusiones de neutrófilos, se asocia con un aumento de la muerte celular debido a la inducción de la apoptosis de las células mieloides.

35 Los agentes actuales usados para el tratamiento de la neutropenia incluyen G-CSF, GM-CSF y G-CSF conjugado con polietilenglicol como G-CSF pegilado. A pesar de la disponibilidad y considerable eficacia de los agentes aprobados anteriores para reducir el riesgo de las complicaciones de la neutropenia continúan siendo problemas importantes en la oncología. Raramente la ruptura del bazo pero más frecuentemente el aumento del volumen del bazo, trastornos de intercambio de gases en el pulmón y casos individuales de lesión aguda cerebrovascular e infarto de miocardio se han observado en los donantes sanos que reciben G-CSF para la recolección de células madre de sangre periférica. Las evidencias de que el G-CSF causa síndromes mielodisplásicos y leucemia mieloide aguda son menos claras y necesitan ser analizadas en estudios prospectivos adicionales a largo plazo.

40 Aunque estos enfoques se han mostrado prometedores, existe una necesidad de enfoques terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico mejorados para el tratamiento de la neutropenia. La presente invención proporciona un método mejorado y fiable para el tratamiento, diagnóstico o profilaxis de la neutropenia que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz a un sujeto que lo necesita de un inhibidor de serina proteasa.

45 Estas y otras finalidades que serán evidentes a partir de lo anterior se han logrado en la presente invención.

50 Breve descripción de la invención

55 La presente invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención de pacientes que sufren de neutropenia que comprende la administración a dicho paciente que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de inhibidores de la serina proteasa. El inhibidor de serina proteasa es un inhibidor de calicreína seleccionado entre los inhibidores de hK2,

hK3, hK4, hK5, hK6, hK7, hK8, hK9, hK10, hK11, hK12, hK13, hK14, hK15 o mezclas de estos. Con la máxima preferencia dicho inhibidor de calicreína se selecciona entre los inhibidores de hK2, hK4, hK11, hK5, hK14 o mezclas de estos. Aún con mayor preferencia dicho inhibidor de calicreína es un inhibidor hK2. Los inhibidores de serina proteasa se seleccionan del grupo que comprende la sec. con núm. de ident. 2, sec. con núm. de ident. 4, sec. con núm. de ident. 6, sec. con núm. de ident. 8, sec. con núm. de ident. 10, sec. con núm. de ident. 12, sec. con núm. de ident. 14, sec. con núm. de ident. 16, sec. con núm. de ident. 18 o mezclas de estos.

Se describen además inhibidores de serina proteasa para usar en un método de tratamiento o prevención de la neutropenia en pacientes que la desarrollan debido a infecciones, septicemia, quimioterapia, irradiación, productos químicos tóxicos o como efectos secundarios de cualquier medicamento. Preferentemente, el número y/o estado de activación de neutrófilos se deteriora. Dichos inhibidores de serina proteasa son además para usar en un método para tratar o prevenir úlceras de la piel en pacientes con diabetes en la que los neutrófilos experimentan la muerte celular, o las úlceras de la piel que se desarrollan en pacientes con enfermedad arterial periférica asociada con afecciones de hipoxia en la piel y disfunción de los neutrófilos y apoptosis. Dichos inhibidores de serina proteasa son además para uso en un método para tratar o prevenir el daño inducido por la irradiación de las células mieloides como ocurre en el curso del tratamiento de la malignidad, accidentes en plantas nucleares o uso de armas nucleares. Dicho inhibidor de serina proteasa es un inhibidor de calicreína seleccionado entre los inhibidores de hK2, hK3, hK4, hK5, hK6, hK7, hK8, hK9 hK10, hK11, hK12, hK13, hK14, hK15 o mezclas de estos. Dichos inhibidores de serina proteasa se seleccionan del grupo que comprende la sec. con núm. de ident. 2, sec. con núm. de ident. 4, sec. con núm. de ident. 6, sec. con núm. de ident. 8, sec. con núm. de ident. 10, sec. con núm. de ident. 12, sec. con núm. de ident. 14, sec. con núm. de ident. 16, sec. con núm. de ident. 18 o mezclas de estos.

Se describen además inhibidores de serina proteasa para uso en la preparación *in vitro* de neutrófilos y de sus precursores de la médula ósea

- para realizar manipulaciones moleculares en la terapia génica antes de la infusión de las células mieloides a los pacientes con neutropenia o trastornos genéticos del sistema mieloides,
- o para usar los neutrófilos y sus precursores de la médula ósea para la infusión a pacientes con neutropenia o disfunción de los neutrófilos.

Preferentemente dichos inhibidores de serina proteasa se seleccionan del grupo que comprende la sec. con núm. de ident. 2, sec. con núm. de ident. 4, sec. con núm. de ident. 6, sec. con núm. de ident. 8, sec. con núm. de ident. 10, sec. con núm. de ident. 12, sec. con núm. de ident. 14, sec. con núm. de ident. 16, sec. con núm. de ident. 18 o mezclas de estos.

La invención proporciona además un método para la prevención de la apoptosis de las células mieloides de pacientes, que comprende la administración a dichos pacientes que lo necesitan de una cantidad terapéuticamente eficaz de inhibidores de serina proteasa:

- (1) durante y después de la transfección de células de médula ósea realizada en la terapia génica,
- (2) durante la movilización de células madre de sangre realizada para la reconstitución de la hematopoyesis y/o
- (3) durante la infusión de las células de linaje mieloides para la reconstitución de la hematopoyesis en la terapia génica o para el tratamiento de la neutropenia mediante la infusión de neutrófilos.

Preferentemente dichos inhibidores de serina proteasa se seleccionan del grupo que comprende la sec. con núm. de ident. 2, sec. con núm. de ident. 4, sec. con núm. de ident. 6, sec. con núm. de ident. 8, sec. con núm. de ident. 10, sec. con núm. de ident. 12, sec. con núm. de ident. 14, sec. con núm. de ident. 16, sec. con núm. de ident. 18 o mezclas de estos.

La descripción también proporciona un estuche para el diagnóstico, pronóstico, profilaxis o tratamiento de la neutropenia en un mamífero, caracterizado porque dicho estuche comprende inhibidores de serina proteasa, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones para su uso. Preferentemente, dicho inhibidores de serina proteasa comprenden una etiqueta detectable o pueden unirse a una etiqueta detectable para formar un complejo detectable. Dicho inhibidor de serina proteasa es un inhibidor de calicreína seleccionado entre los inhibidores hK2, hK3, hK4, hK5, hK6, hK7, hK8, hK9 hK10, hK11, hK12, hK13, hK14, hK15 o mezclas de estos. Dichos inhibidores de serina proteasa se seleccionan del grupo que comprende la sec. con núm. de ident. 2, sec. con núm. de ident. 4, sec. con núm. de ident. 6, sec. con núm. de ident. 8, sec. con núm. de ident. 10, sec. con núm. de ident. 12, sec. con núm. de ident. 14, sec. con núm. de ident. 16, sec. con núm. de ident. 18 o mezclas de estos.

Otras finalidades y ventajas serán evidentes para aquellos con experiencia en la técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada, que procede en referencia a los siguientes dibujos ilustrativos, y reivindicaciones acompañantes.

Breve descripción de las figuras

**Figura 1:** muestra la tinción con anexina-V de los neutrófilos y las células T después de la incubación con inhibidores de proteasa MDPK67b y MDOKG9.

(a) Tinción con anexina-V de los neutrófilos y las células T después de la incubación con MDPK67b. Las células se incubaron durante 24 o 48 horas con MDPK67b a concentraciones en el intervalo de 6  $\mu\text{M}$  a 60  $\mu\text{M}$ , como indicado, o PBS como control. La apoptosis se evaluó mediante tinción con anexina V y análisis por FACS. Las poblaciones de leucocitos indicadas se controlaron en base a su aspecto en un gráfico de puntos FACS de dispersión frontal/dispersión lateral (neutrófilos) o mediante tinción positiva para CD3 (células T).

(b) Tinción con anexina-V de neutrófilos después de la incubación con MDPK67b o MDOKG9 (OKDG9).

Los neutrófilos se incubaron durante 18 horas con concentraciones MDPK67b o MDOKG9 en el intervalo de 60  $\mu\text{M}$  (dilución 1) a 60 pM (dilución 7) como indicado. La apoptosis se evaluó como definido anteriormente.

**Figura 2:** muestra la comparación de varias condiciones de cultivo celular a través de la tinción con anexina-V de neutrófilos tratados con MDPK67b.

Los neutrófilos se cultivaron con las concentraciones indicadas de MDPK67b. PBS sin MDPK67b sirvió como control. Los neutrófilos se sembraron (100  $\mu\text{l}$ /pocillo) ya sea a  $5 \times 10^6/\text{ml}$  (alta densidad) o  $3 \times 10^5/\text{ml}$  (baja densidad) y la apoptosis de los neutrófilos se evaluó mediante la tinción de Anexina V y análisis por FACS. El cultivo de  $5 \times 10^6/\text{ml}$  neutrófilos en medio libre de suero (X-Vivo 15) en lugar de RPMI 10% de FCS se evaluó en paralelo.

**Figura 3:** muestra la reversión de la protección de neutrófilos mediada por MDPK67b usando inhibidores de tirosina quinasa.

(a) Efecto de MDPK67b sobre los niveles de CD16 y CD11b de neutrófilos cultivados. Los neutrófilos se cultivaron con las concentraciones indicadas de MDPK67b y el porcentaje de neutrófilos que expresan altos niveles de CD16 o CD11b se evaluó por FACS. Los gráficos representativos de FACS se muestran.

(b) Reversión del efecto de MDPK67b sobre los niveles de neutrófilos CD16 y CD11b usando PP2. Los neutrófilos se cultivaron con las concentraciones indicadas de MDPK67b en presencia o ausencia del inhibidor de la tirosina quinasa Src PP2 (10  $\mu\text{M}$  de concentración final). La apoptosis y frecuencias relativas de neutrófilos que expresan altos niveles de CD11b y CD16 se midieron por análisis FACS.

**Figura 4:** muestra el efecto de G-CSF en la apoptosis de neutrófilos in vitro.

Los neutrófilos se cultivaron con las concentraciones indicadas de G-CSF y de neutrófilo (a) Apoptosis y (b) regulación negativa de la expresión de CD16 se analizaron por FACS. (c) Los neutrófilos se cultivaron con MDPK67b (0.6  $\mu\text{M}$ ) y cantidades tituladas de G-CSF (concentraciones como indicadas). Los neutrófilos cultivados en medio y PBS (sin MDPK67b) sirvieron como control.

**Figura 5:** muestra Anexina-V y tinción CD16 de neutrófilos tratados con MDPK67b y Etoposid.

(a) Tinción con anexina-V de los neutrófilos tratados con MDPK67b y Etoposid. Las células se incubaron durante 18 horas con MDPK67b (6  $\mu\text{M}$ ) más Etoposid (125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Etoposid sólo o PBS. La apoptosis se evaluó mediante tinción con anexina V y análisis por FACS. Poblaciones de leucocitos relevantes se controlaron en función de su aspecto en un gráfico de puntos de FACS de dispersión frontal o dispersión lateral.

(b) Tinción con anexina-V de los neutrófilos tratados con poco MDPK67b y concentraciones crecientes de Etoposid. Las células se incubaron durante 18 horas con MDPK67b (0.06  $\mu\text{M}$ ) sólo o MDPK67b (0.06  $\mu\text{M}$ ) más concentraciones crecientes de Etoposid (en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) como indicado o PBS. La apoptosis se evaluó mediante la tinción con anexina V y el análisis de FACS se realizó como se señalado anteriormente.

(c) Tinción CD16 de neutrófilos tratados con MDPK67b y Etoposid. Las células se incubaron durante 18 horas con MDPK67b (0.06  $\mu\text{M}$  sólo o MDPK67b (0.06  $\mu\text{M}$ ) más concentraciones crecientes de Etoposid (en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) como indicado o PBS. Los porcentajes de neutrófilos que expresan altos niveles de CD16 se evaluaron mediante análisis de FACS.

Descripción detallada de la invención

Algunas de las serina proteasas de la superfamilia de la quimi tripsina, incluyendo t-PA, plasminas, u-PA y las proteasas de la cascada de coagulación de la sangre son grandes moléculas que contienen, adicionalmente al dominio catalítico de la serina proteasa, otros dominios estructurales responsables en parte de regulación de su actividad (Barrett, 1986; Gerard y otros, 1986; Blasi y otros, 1986).

Entre las serina proteasas importantes están las enzimas de tipo tripsina, tales como tripsina, triptasa, trombina, calicreína y factor Xa. Los objetivos de la serina proteasa se asocian con procesos tales como la coagulación de la sangre: lisis mediada

por el complemento, respuesta inmune, inflamación, detección del dolor, glomerulonefritis, pancreatitis, cáncer, regulación de la fertilización, infección bacteriana y maduración viral. Mediante la inhibición de serina proteasas que tienen alta especificidad por un objetivo en particular, uno puede inhibir in vivo numerosos procesos biológicos, que pueden tener efectos dramáticos sobre un huésped.

5

Los inhibidores de serina proteinasa (serpinas) comprenden un grupo heterogéneo de proteínas que forman una superfamilia ya que incluye más de 100 miembros, de diversos organismos como virus, plantas y seres humanos. Las serpinas han evolucionado por más de 500 millones de años y se separaron filogenéticamente en proteínas con función inhibitoria y función no-inhibidora (Hunt y Dayhoff, 1980). Las serpinas no inhibitorias tales como ovoalbúmina carecen de inhibidor de la actividad proteasa (Remold-O'Donnell, 1993). La función principal de los miembros de la familia serpina parece ser la neutralización de la actividad serina proteinasa sobreexpresada (Potempa y otros, 1994). Las serpinas juegan un papel en la remodelación de la matriz extracelular, la modulación de la respuesta inflamatoria y la migración celular (Potempa y otros, 1994).

10

15

Los inhibidores de serina proteasa se dividen en las siguientes familias: la familia del inhibidor de tripsina pancreática bovina (Kunitz), conocido además como inhibidor de proteasa básica (Ketcham y otros, 1978); la familia Kazal; la familia de inhibidores de subtilisina de Streptomyces; la familia de la serpina; la familia Kunitz del inhibidor de tripsina del frijol de soya; la familia de inhibidores de la patata; y la familia Bowman-Birk (Laskowski y otros, 1980; Read y otros, 1986; Laskowski y otros, 1987). Los inhibidores de serina proteasa pertenecientes a la familia de la serpina incluyen los inhibidores del activador del plasminógeno PAI-1, PAI-2 y PAI-3, inhibidor de la esterasa CI, alfa-2-antiplasmina, contrapsina, alfa-1-antitripsina, antitrombina III, proteasa nexina I, alfa-1-antiquimotripsina, inhibidor de la proteína C, cofactor II de heparina y la proteína regulada por la hormona del crecimiento (Carrel y otros, 1987; Sommer y otros, 1987; Suzuki y otros, 1987; Stump y otros, 1986).

20

25

Muchos de los inhibidores de serina proteasa tienen una amplia especificidad y son capaces de inhibir tanto la superfamilia quimotripsina de proteasas, incluyendo las serina proteasas de la coagulación de la sangre, y la superfamilia de subtilisina de Streptomyces de serina proteasas (Laskowski y otros, 1980). La inhibición de las serina proteasas por serpinas se ha revisado en Travis y otros (1983); Carrell y otros. (1985); y Sprengers y otros (1987). Los datos de la cristalografía están disponibles para un número de inhibidores intactos, incluyendo los miembros de las familias de inhibidores BPTI, Kazal, SSI, tripsina del frijol de soya y patata y para una forma escindida de la serpina alfa 1-antitripsina (Head y otros, 1986). A pesar de que los inhibidores de serina proteasa son proteínas de diversidad en la secuencia de aminoácidos, los inhibidores intactos estudiados hasta la fecha tienen en común un lazo característico, denominado el lazo del sitio reactivo, que se extiende desde la superficie de la molécula que contiene la secuencia de reconocimiento del sitio activo de la serina proteasa afín (Levin y otros, 1983). La similitud estructural de los lazos en los diferentes inhibidores de serina proteasa es notable (Papamokos y otros, 1982). La especificidad de cada inhibidor se cree estar determinada principalmente por la identidad del aminoácido que está inmediatamente amino-terminal al sitio de escisión potencial del inhibidor por la serina proteasa. Este aminoácido, conocido como residuo del sitio Pi, se cree formar un enlace acilo con la serina en el sitio activo de la serina proteasa (Laskowski y otros, 1980). Si una o ninguna serpina posee función inhibitoria depende en gran medida de la secuencia de consenso situada en la región de bisagra del lazo de sitio reactivo cerca del carboxi-terminal de la región codificante. Fuera del lazo del sitio reactivo, los inhibidores de serina proteasa de diferentes familias generalmente no se relacionan estructuralmente, aunque la familia de inhibidores Kazal y la familia subtilisina de Streptomyces mostrar cierta similitud estructural y de secuencia.

30

35

40

45

Como se usa en la presente descripción, las siguientes definiciones se suministran para facilitar la comprensión de la presente invención.

"Un" o "uno" significa "al menos uno" o "uno o más."

50

El término "comprende" se usa generalmente en el sentido de incluir, es decir, permitir la presencia de una o más características o componentes.

55

Como se usa en la presente descripción, los términos "proteína", "polipéptido", "polipeptídico", "péptido" y "peptídico" o "cadena peptídica" se usan de forma intercambiable en la presente descripción para designar una serie de residuos de aminoácidos conectados al otro por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxi de residuos adyacentes.

"Residuo de aminoácido" significa cualquier residuo de aminoácido conocido por los expertos en la técnica. Este abarca aminoácidos de origen natural (que incluyen, por ejemplo, usando el código de tres letras, Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu,

Gly, His, He, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val), así como también aminoácidos raros y/o sintéticos y derivados de estos (que incluyen, por ejemplo, Aad, Abu, Acp, Ahe, Aib, Apm, Dbu, Des, Dpm, Hyl, McLys, McVal, Nva, y similares.

5 Dicho residuo de aminoácido o derivado del mismo pueden ser cualquier isómero, especialmente cualquier isómero quiral, por ejemplo, la isoforma L- o D-.

10 Por derivado de aminoácido, nos referimos de este modo a cualquier derivado de aminoácido que se conoce en la técnica. Por ejemplo, los derivados de aminoácidos incluyen residuos derivable de aminoácidos naturales que contienen cadenas laterales adicionales, por ejemplo, cadenas laterales de alquilo, y/o sustituciones de heteroátomos.

15 "Fragmentos" se refieren a las secuencias que comparten al menos 40% de aminoácidos de longitud con la secuencia respectiva del sitio activo del sustrato. Estas secuencias pueden usarse siempre que presenten las mismas propiedades que la secuencia natural de la que se derivan. Preferentemente estas secuencias comparten más de 70%, preferentemente más de 80%, aún con mayor preferencia más de 90%, en particular más de 95% aminoácidos de longitud con la secuencia respectiva del sitio activo del sustrato.

20 La presente invención además incluye variantes de la secuencia del sitio activo de sustrato. El término "variantes" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácido que difieren en cierta medida de un polipéptido de secuencia nativa, o sea secuencias de aminoácido que varían de la secuencia nativa por sustituciones conservativas de aminoácidos mediante la cual uno o más aminoácidos se sustituyen por otro con las mismas características y funciones conformacionales. Las variantes de secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones, y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácido de la secuencia de aminoácido nativa. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se definen en la presente descripción como los intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

- 25 I. Residuos no polares o ligeramente polares, alifáticos, pequeños: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly  
 II. Residuos positivamente cargados polares: His, Arg, Lys  
 III. Residuos negativamente cargados polares: y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln  
 IV. Residuos aromáticos, grandes: Phe, Tyr, Trp  
 V. Residuos no polares, alifáticos, grandes: Met, Leu, Ile, Val, Cys.

30 El término "caliceína" se refiere a las caliceínas glandulares o de tejidos. Las caliceínas glandular o de tejido son un sub-familia de serina proteasas, con un alto grado de especificidad por el sustrato y expresión diversa en varios tejidos y fluidos biológicos. El término "caliceína" apareció en la literatura por primera vez en los 1930, cuando se encontraron grandes cantidades de enzimas proteasas en aislados del páncreas (páncreas es "Kallikreas" en griego) (Kraut y otros 1930, Werle 1934). En la actualidad las enzimas caliceína se dividen en dos grupos, caliceínas de plasma y tejidos, que difieren significativamente en su peso molecular, especificidad de sustrato, características inmunológicas, estructura genética, y el tipo kinina liberada.

40 Las caliceínas comprenden una familia de serina endopeptidasas de cadena simple homóloga 15, secretada de ~25 a 30 kDa, con ortólogos presentes en especies de al menos seis órdenes de mamíferos. Estas caliceína son hK2, hK3, hK4, hK5, hK6, hK7, hK8, hK9 hK10, hK11, hK12, hK13, hK14 y hK15. Preferentemente las caliceínas son hK2, hK4, hK11 y hK14.

45 "Anticuerpo", como se usa en la presente descripción, se refiere a una clase de proteínas plasmáticas producidas por las células B del sistema inmune después de la estimulación por un antígeno. Anticuerpos de mamífero (es decir, humano) son inmunoglobulinas de la clase Ig G, M, A, E o D. El término "anticuerpo" tal como se usa para los fines de esta invención incluye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, humanos, de internalización, neutralizantes, anti-idiotípicos, fragmentos inmunológicamente activos o derivados de los mismos, proteínas recombinantes que tienen actividad inmunológica, e inmunoconjugados que se unen a caliceína o una serina proteasa anclada a membrana.

50 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado.

55 "Enfermedad", como se usa en la presente descripción, se refiere a una condición patológica de una parte, órgano o sistema de un organismo como resultado de varias causas, tales como infección, defecto genético, o estrés ambiental, y se caracteriza por un grupo identificable de signos o síntomas.

"Mamífero" para los propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o domésticos, tales como perros, caballos, gatos, vacas, monos, etc. Preferentemente, el mamífero es humano.

5 "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que están en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya presentan el trastorno, así como aquellos en los que el trastorno debe prevenirse. Por lo tanto, el mamífero que se trata en la presente descripción puede haber sido diagnosticado con el trastorno o puede estar predispuesto o susceptible a la enfermedad.

10 El término "sujeto" se refiere a los pacientes humanos u otro mamífero, e incluye a cualquier persona que se desea examinar o tratar usando los métodos de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, se entenderá que "paciente" automáticamente no implica que los síntomas o enfermedades estén presentes.

15 La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y típicamente no producen una reacción adversa alérgica o similar, tal como trastorno gástrico, mareo y similares, cuando se administra a un humano.

20 Como se usa en la presente descripción, el término "proteasa" se refiere a una clase de enzimas que reconoce una molécula y escinde una secuencia de activación en la molécula. La proteasa puede ser una endopeptidasa que escinde enlaces peptídicos internos. Como alternativa, la proteasa puede ser una exopeptidasa que hidroliza enlaces peptídicos a partir del extremo N-terminal o el extremo C-terminal de la molécula de polipéptido o proteína. La proteasa se pliega en una conformación para formar un sitio activo que recibe y escinde la secuencia de activación.

25 "Inhibidores" se refiere a un polipéptido, o un compuesto químico, que específicamente inhibe la función de una calicreína o serina proteasa por, preferentemente, la unión a dicha calicreína o serina proteasa.

30 El "lazo de serpina reactivo" o "lazo de sitio reactivo" o RSL se refiere a un lazo de sitio reactivo flexible, expuesto, encontrado en la serpina y que está implicado en la interacción con la proteasa objetivo putativa. A partir del residuo en el lateral de aminoácido del enlace escindible, y alejándose del enlace, los residuos son convencionalmente llamados, P1, P2, P3, etc. Los residuos que siguen el enlace escindible son llamados P1', P2', P3', etc. Por lo general, el RSL se compone de 6 a 12 residuos de aminoácidos.

35 La "serina proteasa" o serpina puede seleccionarse del grupo que comprende la  $\alpha$ -1antiquimotripsina (ACT), inhibidor de proteína C (PCI),  $\alpha$ -1antiproteínasa (AAT), precursor de la proteína relacionada con la  $\alpha$ -1antitripsina humana (ATR), inhibidor de la  $\alpha$ -2-plasmina (AAP), precursor de la antitrombina-III humana (ATIII), inhibidor de proteasa 10 (PI10), precursor de la proteína 2 de unión a colágeno humano (CBP2), inhibidor de proteasa 7 (PI7), leuserpina inhibidor de proteasa 2 (HLS2), inhibidor de la proteasa C1 de plasma humano (C1 INH), inhibidor de la elastasa monocito/neutrófilo (M/NEI), inhibidor del activador del plasminógeno tipo 3 (PAI3), inhibidor de proteasa 4 (PI4), inhibidor de proteasa 5 (PI5), inhibidor de proteasa 12 (PI12), inhibidor del activador del plasminógeno humano tipo 1 precursor endotelial (PAI-I), inhibidor del activador de plasminógeno humano tipo 2 de la placenta (PAI2), precursor del factor derivado del epitelio pigmentado humano (PEDF), inhibidor de proteasa 6 (PI6), inhibidor de proteasa 8 (PI8), inhibidor de proteasa 9 (PI9), antígeno 1 humano asociado al carcinoma de células escamosas (SCCA-1), antígeno 2 humano asociado al carcinoma de células escamosas (SCCA-2), globulina de unión a T4 (TBG), Megsin, e inhibidor de proteasa 14 (PI14), fragmentos de estos, quimeras moleculares de estos, combinaciones de estos y/o variantes de estos.

45 Ya que la mayoría de estas serpinas tiene diferentes nombres, el Solicitante incluye más abajo una tabla que resume las especificaciones:

Tabla I

5

10

15

20

Serpina	Número de Acceso	Secuencia RSL
PI o AAT_PRECURSOR DE ANTITRIPSINA ALFA-1 HUMANA A1AT, (INHIBIDOR DE ALFA-1 PROTEASA) (ALFA-1- ANTIPROTEINASA)	sp P01009	GTEAAGAMFLEAIPMSIPPE
PIL o ATR, PRECURSOR DE PROTEÍNA RELACIONADA CON ANTITRIPSINA ALFA-1 HUMANA, A1AU	sp P20848	GTEATGAPHLEEKAWSKYQT
PLI O AAP, PRECURSOR DE ANTIPLASMINA ALFA-2 HUMANA, A2AP, (INHIBIDOR DE ALFA-2-PLASMINA) (ALFA-2-PI) (ALFA-2-AP)	sp P08697	GVEAAAATSIAMSRMSLSSF
AACT, PRECURSOR DE ALFA-1 ANTIQUIMOTRIPSINA (ACT) HUMANA_ AACT	sp P01011	GTEASAATAVKITLLSALVE
AT3, PRECURSOR DE ANTITHROMBINA HUMANA-III, ANT3 (ATIII)	sp P01008	GSEAAASTAVIAGRSLNPN
PI10, BOMAPINA BOMA_HUMANA (INHIBIDOR 10 DE PROTEASA)	sp P48595	GTEAAAGSGSEIDIRVPS

ES 2 534 832 T3

	CBP2, PRECURSOR DE LA PROTEINA 2 DE UNIÓN A COLÁGENO HUMANA CBP2 (COLIGINA 2),	sp P50454	GNPFDQDIYGREELRSPKLF
5	PI7 o PN1, PRECURSOR DE NEXINA DERIVADA DE GLIA HUMANA GDN (GDN) (PROTEASA NEXINA I) (PN-1) (INHIBIDOR DE PROTEASA 7)	sp P07093	GTKASAATTAILIARSSPPPWW
	HCF2, PRECURSOR DEL COFACTOR II (HC-II) DE HEPARINA HUMANA, HEP2 (INHIBIDOR DE PROTEASA LEUSERPINA 2) (HLS2)	sp P05546	GTQATTVTTVGFMDPLSTQVR
10	C1NH o C1IN, PRECURSOR DEL INHIBIDOR DE PROTEASA C1 PLASMÁTICA HUMANA, IC1 (C1 INH)	sp P05155	GVEAAAASAI SVARTLLVFE
	ELANH2 o PI2, INHIBIDOR DE ELASTASA (LEI) DE LEUCOCITO HUMANO, ILEU (INHIBIDOR MONOCITO E/NEUTROFILO ELASTASA) (M/NEI) (EI)	sp P30740	GTEAAAATAGIATFCMLMPE
15	PCI o PLANH3 o PROCI, PRECURSOR DEL INHIBIDOR DE PROTEASA (PCI) DE SERINA PLASMÁTICA HUMANA, IPSP (INHIBIDOR PROTEÍNA C) (INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO-3) (PAI3)	sp P05154	GTRAAAATGTIFTFRSARLN
20	PI4 o KST, PRECURSOR DE CALISTATINA HUMANA, KAIN (INHIBIDOR DE CALICREINA) (INHIBIDOR DE PROTEASA4)	sp P29622	GTEAAAATTFAIKFFSAQTN
	PI5, PRECURSOR DE MASPINA HUMANA, MASP (INHIBIDOR DE PROTEASA 5)	sp P36952	GGDSIEVPGARILQHKDELN
25	PI12, PRECURSOR DE NEUROSERPINA HUMANA, NEUS (INHIBIDOR DE PROTEASA12)	sp Q99574	GSEAAAVSGMIAISRMAVLY
	PAI1 o PLANH1, PRECURSOR DEL INHIBIDOR-1 ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO HUMANO sp P05121 PAI1, ENDOTELIAL (PAI-1)	sp P05121	GTVASSSTAVIVSARMAPEE
30	PAI2 o PLANH2, INHIBIDOR-2 DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO HUMANO, PAI2, PLACENTA (PAI-2) (MONOCITO ARG- SERPINA) (INHIBIDOR DE UROQUINASA)	sp P05120	GTEAAAGTGGVMTGRTGHGG
35	PEDF, PRECURSOR DEL FACTOR DERIVADO DEL EPITELIO PIGMENTADO HUMANO- PEDF (PEDF) (EPC-1)	sp P36955	GAGTTPSPGLQPAHLTFPLD
	PI6 o PTI, INHIBIDOR DE TROMBINA DE PLACENTA HUMANA PTI6 (ANTIPROTEINASA CITOPLÁSMICA) (CAP) (INHIBIDOR DE PROTEASA 6)	sp P35237	GTEAAAATAAIMMMRCARFV
40	PI8, ANTIPROTEINASA 2 CITOPLÁSMICA (CAP2) HUMANA PTI8 (CAP-2) (INHIBIDOR DE PROTEASA8)	sp P50452	GTEAAAATAWRNSRCSRME
	PI9, ANTIPROTEINASA 3 CITOPLÁSMICA (CAP3) HUMANA PTI9 (CAP-3) (INHIBIDOR DE PROTEASA 9)	sp P50453	GTEAAAASSCFVVAECCMES
45	SCCA1, ANTÍGENO 1 ASOCIADO AL CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS HUMANAS SCCA1 (SCCA-1) (PROTEÍNA T4-A)	sp P29508	GAEAAAATAWFGSSPAST
	SCCA2, ANTÍGENO 2 ASOCIADO AL CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS HUMANAS SCC2 (SCCA-2) (LEUPINA)	sp P48594	GVEAAAATAVVVELSSPST
50	TBG, PRECURSOR DE GLOBULINA DE UNIÓN A TIROXINA HUMANA THBG (GLOBULINA DE UNIÓN A T4)	sp P05543	GTEAAAVPEVELSDQPENTF
55	MEGSIN	gij 4505149 ref N P_003775.1	GTEATAATGSNIVEKQLPQS
	PI14, pancpin, TSA2004	gij 3724282 dbj B AA33766.1	GSEAAATSTGIHIPVIMSLAQ

El inhibidor de serina proteasa de la invención es un inhibidor de calicreína. Los inhibidores de calicreína de la invención se seleccionan entre los inhibidores de hK2, hK3, hK4, hK5, hK6, hK7, hK8, hK9, hK10, hK11, hK12, hK13, hK14 o hK15. Preferentemente, los inhibidores de calicreína se seleccionan entre los inhibidores de hK2, hK4, hK11, hK5 y hK14. Con mayor preferencia, el inhibidor de calicreína es un inhibidor de hK2.

Se abarcan por la presente descripción las proteínas inhibidoras recombinantes de una Calicreína, que comprenden una secuencia de serpina en donde el lazo de serpina reactivo P6-P6' de dicha secuencia de serpina comprende al menos una secuencia del sitio activo del sustrato específico para dicha calicreína, fragmentos biológicamente activos de estos, una quimera molecular de esto, una combinación de esto y/o variantes de estos. Dicha al menos una secuencia del sitio activo del sustrato específico para dicha calicreína, es un péptido del sustrato seleccionado por Calicreína usando una genoteca de pentapéptido aleatoria de presentación de fago como se describe en la Solicitud de Patente Internacional PCT/IB2004/001040 (Universidad de Lausanne).

Particularmente, en caso de que el inhibidor de calicreína es un inhibidor dirigido contra hK2, dicho inhibidor puede seleccionarse entre los descritos en la Solicitud de Patente Internacional PCT/IB2004/001040. Preferentemente, el inhibidor de calicreína de la invención puede seleccionarse del grupo que comprende MD820, MD62, MD61, MD67 y MDCI. Con la máxima preferencia este inhibidor es MD62 o MD61 y aún con mayor preferencia el inhibidor es MDPK67b. Esta solicitud describe una proteína inhibidora quimérica de una proteasa que comprende una secuencia polipeptídica inhibidora y al menos una secuencia polipeptídica de un sitio de interacción sustrato-enzima específico para una proteasa así como un método para producir la proteína inhibidora quimérica de una proteasa. Preferentemente, la secuencia de ADN aislada y purificada que codifica el inhibidor de serina proteasa de la invención se selecciona del grupo que comprende la sec. con núm. de ident. 1, sec. con núm. de ident. 3, sec. con núm. de ident. 5, sec. con núm. de ident. 7, sec. con núm. de ident. 9, sec. con núm. de ident. 11, sec. con núm. de ident. 13 y sec. con núm. de ident. 15. Con la máxima preferencia, la secuencia de ADN aislada y purificada que codifica el inhibidor de serina proteasa de la invención es la sec. con núm. de ident. 15.

Como un ejemplo de inhibidor de serina proteasa de acuerdo con la invención, los Solicitantes encontraron sorprendentemente 6 nuevas proteínas quiméricas inhibidoras específicas para la proteasa hK2 como se resume más abajo en la Tabla II, estos inhibidores son:

Tabla II

Inhibidores Quiméricos	Otros Nombres	Sec. ID núm. (proteína)
rACT <sub>8,20</sub>	MD820	2
rACT <sub>6,2</sub>	MD62	4
rACT <sub>8,3</sub>	MD83	6
rACT <sub>6,7</sub>	MD67	8
rACT <sub>6,1</sub>	MD61	10
ACT <sub>5,18</sub>	MD518	12
MDCI		14
MDPK67b		16

Estas proteínas inhibidoras quiméricas se han obtenido por modificación del RSL de la  $\alpha$ 1-antiquimotripsina (rACT), que se sabe que inhibe un gran panel de enzimas humanas tales como quimotripsina, quimasa de mastocitos, cathepsina G, calicreínas prostáticas hK2 y PSA (hK3), con el fin de cambiar la especificidad de esta serpina. Las secuencias de péptidos, seleccionadas como sustratos para la enzima hK2 por la tecnología de presentación en fagos como se explica en la solicitud de patente internacional PCT/IB2004/001040, se han usado para reemplazar el enlace escindible y los residuos de aminoácidos vecinos del RSL. Los inhibidores recombinantes se produjeron en bacterias y se purificaron por cromatografía de afinidad.

Además, los solicitantes encontraron que el reemplazo de los residuos P3-P3' situados en la estructura RSL de rACT<sub>silvestre</sub> por el pentapéptido sustrato que codifica para el RSL del inhibidor de la proteína C (PCI) conduce a la producción de un inhibidor quimérico (MDCI) que es capaz de inhibir las calicreínas hK2 y hK3.

5 En caso de que el inhibidor de calicreína es un inhibidor dirigido contra hK14, después dicho inhibidor se puede seleccionar entre los descritos en la prioridad de la Solicitud de Patente Internacional PCT/IB2005/000504. Preferentemente, dicho inhibidor recombinante puede seleccionarse del grupo que comprende AAT<sub>G1</sub>, AAT<sub>G1G</sub>, AAT<sub>C11</sub>, AAT<sub>C11G</sub>, AAT<sub>E5</sub>, AAT<sub>E8</sub>, AAT<sub>F11</sub>, AAT<sub>F3</sub>, AAT<sub>G9</sub>, ACT<sub>G1</sub>, ACT<sub>G1G</sub>, ACT<sub>C11</sub>, ACT<sub>C11G</sub>, ACT<sub>E5</sub>, ACT<sub>E8</sub>, ACT<sub>F11</sub>, ACT<sub>F3</sub>, ACT<sub>G9</sub> (sec. con núm. de ident. 17), ACT<sub>G1V</sub>, y ACT<sub>C11D</sub>. Preferentemente, dicha proteína inhibidora de una proteasa hK14 es AAT<sub>G1</sub>, AAT<sub>G1G</sub>, AAT<sub>C11</sub>, AAT<sub>C11G</sub>, AAT<sub>E5</sub>, AAT<sub>E8</sub>, AAT<sub>F3</sub>, AAT<sub>G9</sub>, ACT<sub>G1G</sub>, ACT<sub>C11</sub>, ACT<sub>C11G</sub>, ACT<sub>E5</sub>, ACT<sub>E8</sub>, AGT<sub>F11</sub>, ACT<sub>F3</sub>, ACT<sub>G9</sub> (sec. con núm. de ident. 18), ACT<sub>G1V</sub>, o ACT<sub>C11D</sub>. Esta solicitud describe una proteína inhibidora quimérica de una proteasa hK14 que tiene una secuencia polipeptídica inhibidora y al menos una secuencia polipeptídica de un sitio de interacción sustrato-enzima específico para dicha proteasa hK14, en donde dicha proteína inhibidora quimérica de una proteasa hK14 tiene, bajo condiciones fisiológicas,

- 15 i) una estequiometría de inhibición (SI) igual o por debajo de 11.7 después de al menos 4 horas de incubación,
- 20 ii) una velocidad de asociación (Ka) de al menos  $7'500 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,
- iii) una actividad inhibidora de 100% después de al menos 30 minutos de incubación.

Además, la secuencia inhibidora polipeptídica del inhibidor de proteasa se puede seleccionar además de una cisteína proteasa ya que hay ahora un número de casos bien documentados de la inhibición de las cisteína proteasas por serpinas (*Gettins P. G. W.*, 2002 "Serpin structure, mechanism, and function" en *Chem. Rev.*, 102, 4751-4803). Estos ejemplos incluyen la inhibición de las catepsinas K, L y S por el antígeno 1 del carcinoma de células escamosas de la serpina, inhibición de la prohormona tiol proteinasa por la  $\alpha$ -1antiquimotripsina, y la inhibición de los miembros de la familia de las caspasas, que incluyen caspasa 1 (enzima de conversión de la interleucina 1 $\beta$ ), caspasa 3, y caspasa 8 por la serpina viral crmA y caspasas 1, 4 y 8 por la serpina PI9 humana.

30 Se contempla además por la presente invención las mezclas de inhibidores de serina proteasa, anticuerpos, Peptacuerpos y fragmentos biológicamente activos de estos.

Los anticuerpos de acuerdo con la descripción pueden unir selectivamente una calicreína o una serina proteasa y no se unirán (o se unirán débilmente) a un polipéptido no objetivo. Se pueden unir además a una calicreína de origen natural o serina proteasa o a polipéptidos recombinantes de estos. Los anticuerpos de la invención pueden unir una calicreína o serina proteasa expresada por una célula es decir expresada por una célula que incluye superficie de la célula, unida a membrana, formas citoplasmática o secretadas. Pueden unir además uno o más dominios en el calicreína o la serina proteasa, que incluyen dominio(s) citoplasmático, transmembrana, y/o extracelular. Como alternativa, pueden unirse a cualquiera de calicreína o serina proteasa en su forma nativa y/o desnaturalizada.

40 Se entiende por aquellos con experiencia en la materia que las regiones o epitopes de la calicreína o serina proteasa para el que un anticuerpo se dirige pueden variar con la solicitud pretendida.

45 El anticuerpo de acuerdo con la descripción puede reconocer y unirse a cualquier porción de la calicreína o la serina proteasa, que incluye el dominio de citoplasmático, dominio transmembrana, y/o el dominio extracelular, o cualquier porción de estos tales como fragmentos o derivados de estos.

Los anticuerpos de acuerdo con la descripción pueden ser preparaciones policlonales que incluyen una población de anticuerpos diferentes dirigidos contra un epitope diferente en el inmunógeno, tal como una calicreína o serina proteasa usado como un inmunógeno.

50 Los anticuerpos policlonales pueden producirse por métodos bien conocidos en la técnica. Generalmente, cualquier anticuerpo (por ejemplo, monoclonal, policlonal, y similares) se puede elevar usando una calicreína aislada o una serina proteasa, o un fragmento como el inmunógeno. Adicionalmente, el inmunógeno puede ser una proteína de fusión que incluye todo o una porción de los polipéptidos objetivos fusionados a V5, His, proteína de unión a maltosa, GST, o Ig humana. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales se han elevado previamente usando una proteína de fusión que tiene el dominio extracelular de, por ejemplo, hepsina humana fusionada a la proteína de unión a maltosa (Y Kazama, y otros, 1995

J Biol Chem 270:66-72). Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser anticuerpos monoclonales que se unen a un sitio antigénico específico presente en la calicreína o la serina proteasa.

- 5 Los métodos para preparar un inmunógeno e inmunizar un animal se conocen bien en la técnica (Kohler y Milstein 1975 Nature 256:495-497; Brown y otros. 1981 J Immunol 127:539-46; Brown y otros, 1980 J Biol Chem 255:4980-83; Yeh y otros, 1976 Proc Natl Acad Sci USA 76:2927-31; Yeh y otros, 1982 Int J Cancer 29:269-75; Kozbor y otros, 1983 Immunol Today 4:72; Cole y otros, 1985 Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96; patente de los Estados Unidos núm. 4,816,567; Clackson, y otros, 1991 Nature 352:624-628; Marks, y otros, 1991 J Mol Biol 222:581-597).
- 10 La presente invención prevé además el caso en que los inhibidores de calicreína y/o los inhibidores de serina proteasa están en forma de Peptacuerpos.  
Un "Peptacuerpo" como se describe en WO 98/18943 (Kajava y otros) y WO2004087766 (Universidad de Lausanne) es una molécula de alta avididad que usa el concepto de multimerización para inducir señales celulares aberrantes. El dominio de multimerización consiste de una parte de la proteína humana (COMP) de la matriz oligomérica del cartílago, que se fusiona a una región bisagra o un espaciador (preferentemente que contiene 19 aminoácidos de IgA humana) y un dominio (dominio de unión) capaz de unir a un aceptor (ligando). El concepto de molécula peptacuerpo permite una unión apretada en las células o tejidos que expresan alto nivel del marcador calicreína y serina proteasa. "Decacuerpos" se construyen bajo el mismo principio con la diferencia que poseen diez brazos y consecuentemente diez dominios de unión.
- 15
- 20 Usualmente, las enfermedades de acuerdo con la invención son enfermedades en las que el número de leucocitos polimorfonucleares, los neutrófilos se han convertido en un problema por estar disminuidos debido a infecciones, septicemia, irradiación, quimioterapia, efectos secundarios de fármacos o la acción de productos químicos tóxicos.
- 25 La invención incluye además la aplicación tópica de inhibidores de calicreína en úlceras diabéticas de la piel para prevenir la muerte celular de neutrófilos y de ese modo restituir la celularidad y funciones de neutrófilos.
- La invención incluye además el uso in-vitro de inhibidores de calicreína para la preparación de neutrófilos y sus precursores de médula ósea para realizar manipulaciones moleculares para terapia génica o usar neutrófilos y sus precursores de médula ósea para infusiones a los pacientes.
- 30
- La invención incluye el tratamiento de los pacientes que reciben células madre o células precursoras mieloides o transfusiones de neutrófilos con inhibidores de calicreína o los inhibidores de serina proteasa.
- 35 La presente invención se dirige además a una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de calicreína como se describe en la presente descripción como un agente activo, opcionalmente en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.
- Preferentemente, la composición, como una composición farmacéutica, de acuerdo con la invención debe ser administrada a un paciente con necesidad de tratamiento a través de cualquier ruta adecuada, por lo general por vía oral o por inyección en el torrente sanguíneo o CSF, o por vía subcutánea o directamente en el sitio de interés, o cerca de este sitio.
- 40
- Preferentemente, la composición de acuerdo con la invención además se puede añadir a las soluciones de infusión preparadas para infusiones de células de médula ósea, células mieloides y neutrófilos.
- 45 De acuerdo con otra modalidad, la composición de la invención se puede añadir además a las soluciones que se usan en manipulaciones in-vitro de células de médula ósea y neutrófilos para la terapia génica o en la congelación celular para almacenamiento de las células.
- 50 De acuerdo con una modalidad adicional, la composición de la invención se puede aplicar localmente a la piel en las úlceras isquémica de la piel o diabética.
- La dosis precisa dependerá de un número de factores, que incluyen si la composición es para la profilaxis o para el tratamiento, la naturaleza precisa de la composición, y la naturaleza de la etiqueta detectable o funcional unida al inhibidor de calicreína o el inhibidor de serina proteasa.
- 55 La presente composición farmacéutica comprende como una sustancia activa una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición como se describe, opcionalmente en combinación con portadores farmacéuticamente aceptables, diluyentes y adyuvantes.

"Una cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a un material o compuesto químico que, cuando se administra a un organismo humano o animal induce un efecto farmacológico y/o fisiológico detectable.

5 La cantidad farmacéuticamente eficaz de una unidad de dosificación de inhibidor de calicreína y/o inhibidor de serina proteasa como se describe en la presente descripción por lo general está en el intervalo de 0.001 ng a 100 µg por kg de peso corporal del paciente que se trata.

10 La composición farmacéutica puede contener uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, diluyentes y adyuvantes.

15 Los portadores, diluyentes y adyuvantes aceptables que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en la preparación que pueden usarse farmacéuticamente son generalmente no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como octadecildimetilbencil cloruro de amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propilparabén; catacol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos que aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo los complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos, tal como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).

20 La forma de administración de la composición farmacéutica puede ser sistémica o tópica. Por ejemplo, la administración de una composición de este tipo puede ser varias rutas parenterales tales como subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, rutas bucales o a través de un dispositivo implantado, y puede ser además suministrada por medios peristálticos.

25 La composición farmacéutica, como se describe en la presente descripción, puede incorporarse o impregnarse además en una matriz bioabsorbible, donde la matriz se administra en forma de una suspensión de la matriz, un gel o un soporte sólido. Adicionalmente la matriz puede estar compuesta por un biopolímero.

30 Las preparaciones de liberación sostenida pueden prepararse. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, dichas matrices son en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxiethyl-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de los Estados Unidos núm. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y [gamma] etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no-degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT(TM) (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

35 Las formulaciones que se usan para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por ejemplo mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se entiende que la dosificación adecuada de presente composición será dependiente de la edad, sexo, salud, y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, y la naturaleza del efecto deseado.

45 La forma de dosificación adecuada dependerá de la enfermedad, el inhibidor, y el modo de administración; las posibilidades incluyen tabletas, cápsulas, pastillas, pastas dentales, supositorios, inhaladores, soluciones, pomadas y depósitos parenterales.

50 Ya que las modificaciones de aminoácido de los aminoácidos (del inhibidor por ejemplo) son abarcadas además por la presente invención, esto puede ser útil para la reticulación del inhibidor a una matriz insoluble en agua u otros portadores macromoleculares, o para mejorar la solubilidad, la adsorción, y la permeabilidad a través de la barrera de sangre del cerebro. Tales modificaciones se conocen bien en la técnica y alternativamente pueden eliminar o atenuar cualquier posible efecto secundario indeseable del péptido y similares.

55 Usualmente, los inhibidores de calicreína de la invención pueden comprender una etiqueta detectable o pueden unirse a una etiqueta detectable para formar un complejo detectable.

"Etiqueta detectables" son moléculas detectables o porción de detección para fines de diagnóstico, tales como enzimas o péptidos que tienen una propiedad de unión particular, por ejemplo, estreptavidina o peroxidasa de rábano picante. La porción de detección incluye, además, porciones químicas, tales como biotina que se pueden detectar a través de la unión a una porción específica detectable afín, por ejemplo, etiqueta de avidina.

5 Preferentemente, las etiquetas detectables incluyen etiquetas fluorescentes y etiquetas usadas convencionalmente en la técnica para la imagen MRI-CT. Un número de materiales fluorescentes son conocidos y se pueden utilizar como etiquetas. Estos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, rojo de Texas, azul AMCA y Amarillo Lucifer.

10 Los inhibidores de calicreína de la invención pueden portar una etiqueta radioactiva como la porción de detección, tales como los isótopos  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{121}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  y  $^{186}\text{Re}$ . Cuando se usan etiquetas radiactivas, pueden usarse procedimientos de recuento disponibles conocido actualmente para identificar y cuantificar los miembros de la unión específica. En el caso donde la etiqueta es una enzima, la detección puede realizarse por cualquiera de las técnicas, colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas utilizadas actualmente conocidas en la técnica.

15 En el caso de imagenología in vivo, las etiquetas de la presente invención se pueden conjugar a un agente de imagenología en lugar de un radioisótopo (s), que incluye, pero sin limitarse a un agente potenciador de imagen de resonancia magnética. Ejemplos de grupos quelantes incluyen EDTA, porfirinas, poliaminas éteres corona y polioximas.

20 Los ejemplos de iones paramagnéticos incluyen gadolinio, hierro, manganeso, renio, europio, lantano, holmio y erbio.

Otro tema de la presente descripción es proporcionar un estuche para el diagnóstico, pronóstico, profilaxis o tratamiento de la neutropenia en un mamífero, dicho estuche que comprende la composición de la invención, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso.

25 El estuche puede comprender además una forma de dosificación farmacéutica separada que comprende por ejemplo un agente anti-cáncer seleccionado del grupo que consiste de agentes quimioterapéuticos, anticuerpos anti-receptores del factor de crecimiento epidérmico, agentes radioinmunoterapéuticos, y combinaciones de estos.

30 Generalmente, el estuche comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociada con el recipiente. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, etc. Los contenedores pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente porta una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o inserto del empaque indica que la composición se usa para tratar la afección escogida, tal como la neutropenia.

35 Como alternativa, o adicionalmente, el estuche puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina regulada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

40 La presente invención además describe el uso de la composición de la invención, como una herramienta farmacológica en el desarrollo y estandarización de sistemas de prueba *in vitro* e *in vivo* para el diagnóstico, pronóstico, profilaxis o el tratamiento de la neutropenia en los mamíferos.

45 La presente invención proporciona además un ensayo de detección para el diagnóstico, pronóstico, profilaxis o tratamiento de la neutropenia en una muestra de tejido que comprende poner en contacto la muestra de tejido con la composición de la invención, determinar y medir la cantidad de marcador detectado y correlacionar esta cantidad con la presencia o ausencia de la neutropenia en dicha muestra de tejido.

50 Aquellos con experiencia en la materia apreciarán que la invención descrita en la presente descripción es susceptible a variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. La presente descripción, por lo tanto, debe ser considerada como en todos los aspectos ilustrados y no restrictiva, siendo indicado el alcance de la invención por las Reivindicaciones adjuntas.

55 La descripción anterior se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos, son, sin embargo, ilustrativos de los métodos de la práctica de la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

### Ejemplos

**Efecto in vitro de MDPK67B en la supervivencia celular de neutrófilo.**

5 Para evaluar la viabilidad de los neutrófilos in-vitro, sangre periférica de donantes sanos fue de eritrocito lisados y se  
 10 aislaron los neutrófilos o células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Los cultivos en RPMI 10% de FCS se  
 realizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) a menos que se indique de cualquier otra forma.  
 El porcentaje de neutrófilos o PBMCs apoptóticos se evaluó basado en la unión de proteína Anexina V fluorescente o  
 medición de expresión en la superficie de CD11b o CD16 por análisis FACS (clasificador de células activadas por  
 fluorescencia).

**Ejemplo 1: MDPK67b redujo la apoptosis de los neutrófilos in vitro de una manera dependiente de la dosis pero no tiene efecto significativo en la supervivencia de células T.**

15 Figura 1: Tinción con anexina-V de los neutrófilos y células T tras la incubación con inhibidores de proteasas MDPK67b y  
 MDOKG9.

20 Figura 1a: Tinción con Anexina-V de los neutrófilos y las células T tras la incubación con MDPK67b. Las células se  
 incubaron durante 24 o 48 horas con MDPK67b en concentraciones que van desde  $6 \mu\text{M}$  a  $60 \mu\text{M}$ , como se indica, o PBS  
 como control. La apoptosis se evaluó mediante tinción con Anexina V y análisis FACS. Las poblaciones de leucocitos  
 indicadas, se clasificaron basado en su apariencia en un gráfico de puntos del FACS de dispersión frontal/dispersión lateral  
 (neutrófilos) o mediante tinción positiva de CD3 (células T).

25 Figura 1b: Tinción con Anexina-V de neutrófilos tras la incubación con MDPK67b o MDOKG9 (MDOKG9).  
 Los neutrófilos se incubaron durante 18 horas con concentraciones de MDPK67b o MDOKG9 que van desde  $60 \mu\text{M}$  (dilución  
 1) a  $60 \text{ pM}$  (dilución 7) como se indica. La apoptosis se evaluó como se describe anteriormente.

30 Conclusión: MDPK67b a dosis que van desde  $60 \mu\text{M}$  hasta  $0.6 \mu\text{M}$  inhiben la apoptosis de los neutrófilos. MDOKG9 tuvo un  
 efecto similar protegiendo los neutrófilos que entran en la apoptosis. Este efecto fue específico para los neutrófilos y  
 MDPK67B no inhibió la apoptosis de los monocitos o linfocitos.

**Ejemplo 2: La protección mediada por MDPK67b de los neutrófilos contra la apoptosis es independiente de las condiciones de cultivo.**

35 Figura 2: Comparación de varias condiciones de cultivo celular a través de tinción con Anexina-V de neutrófilos tratados con  
 MDPK67b.

40 Los neutrófilos se cultivaron con las concentraciones indicadas de MDPK67b. PBS sin MDPK67b sirvió como un control. Los  
 neutrófilos se sembraron ( $100 \mu\text{l/pocillo}$ ) ya sea a  $5 \times 10^6/\text{ml}$  (alta densidad) o  $3 \times 10^5/\text{ml}$  (baja densidad) y la apoptosis de los  
 neutrófilos se evaluó mediante tinción con Anexina V y análisis FACS. El cultivo de  $5 \times 10^6/\text{ml}$  de neutrófilos en medio libre de  
 suero (X-Vivo 15) en lugar de RPMI 10% de FCS se evaluó en paralelo.

45 Conclusión: MDPK67b inhibe la apoptosis de los neutrófilos in vitro independientemente de la densidad celular y la  
 presencia o ausencia de suero en el medio de crecimiento.

**Ejemplo 3: El inhibidor PP2 de la tirosina quinasa Src invierte la disminución en la apoptosis de los neutrófilos mediado por MDPK67b.**

Figura 3: Reversión de la protección de los neutrófilos mediada por MDPK67b mediante inhibidores de la tirosina quinasa.

50 Figura 3a: Efecto de MDPK67b en los niveles de CD16 y CD11b de neutrófilos cultivados. Los neutrófilos se cultivaron con  
 las concentraciones indicadas de MDPK67b y el porcentaje de neutrófilos que expresan altos niveles de CD16 o CD11b se  
 evaluó por FACS. Se muestran gráficos de FACS representativos.

55 Figura 3b. Reversión del efecto de MDPK67b en los niveles de neutrófilos CD16 y CD11b mediante PP2. Los neutrófilos se  
 cultivaron con las concentraciones indicadas de MDPK67b en presencia o ausencia del inhibidor PP2 de la tirosina quinasa  
 Src ( $10 \mu\text{M}$  de concentración final). La apoptosis y frecuencias relativas de neutrófilos que expresan alto CD11b y CD16 se  
 midieron por análisis FACS.

Conclusión: MDPK67b aumenta dependiendo de la dosis la frecuencia de los neutrófilos que expresan CD16 y CD11b en niveles altos que se asocia con disminución de la apoptosis. La frecuencia aumentada de neutrófilos que expresan CD11b alto y la apoptosis disminuida en presencia de MDPK67b puede invertirse en presencia del inhibidor PP2 de tirosina quinasa Src. Se observaron efectos similares con otros inhibidores de quinasa que bloquean las vías de señalización intracelulares, que incluyen el inhibidor Ly294002 de PI3K y el inhibidor PD98059 de ERK.

**Ejemplo 4: Efecto superior de MDPK67b en comparación con G-CSF en la protección de los neutrófilos de la apoptosis.**

Figura 4: Efecto de G-CSF en la apoptosis in vitro de neutrófilo.

Los neutrófilos se cultivaron con las concentraciones indicadas de G-CSF y neutrófilo.

La apoptosis (a) y regulación negativa de la expresión de CD16 (b) se analizaron por FACS. (c) Los neutrófilos se cultivaron con MDPK67b (0.6  $\mu$ M) y cantidades tituladas de G-CSF (concentraciones como se indica). Los neutrófilos cultivados en medio y PBS (sin MDPK67b) sirvieron como un control.

Conclusión: El efecto de MDPK67b en la apoptosis de neutrófilos no se afecta por G-CSF, que por sí solo tiene sólo un efecto protector leve sobre la apoptosis de neutrófilos.

**Ejemplo 5: MDPK67b reduce la apoptosis de neutrófilos inducida por el fármaco citostático.**

Figura 5: Tinción con Anexina-V y CD16 de neutrófilos tratados con MDPK67b y Etopósido.

Figura 5a: Tinción con Anexina-V de neutrófilos tratados con MDPK67b y Etopósido. Las células se incubaron durante 18 horas con MDPK67b (6  $\mu$ M) más Etopósido (125  $\mu$ g/ml), Etopósido solo o PBS. La apoptosis se evaluó mediante tinción con Anexina V y análisis FACS. Las poblaciones de leucocitos relevantes se clasificaron en base a su aparición en un gráfico de puntos de FACS de dispersión frontal o dispersión lateral.

Figura 5b: Tinción con Anexina-V de los neutrófilos tratados con concentraciones bajas de MDPK67b y crecientes de Etopósido.

Las células se incubaron durante 18 horas con MDPK67b (0.06  $\mu$ M) solo o MDPK67b (0.06  $\mu$ M) más concentraciones crecientes de Etopósido (en  $\mu$ g/ml) como se indica o PBS. La apoptosis se evaluó mediante tinción con Anexina V y el análisis FACS se realizó como se mencionó anteriormente.

Figura 5c: Tinción de CD16 de neutrófilos tratados con MDPK67b y Etopósido. Las células se incubaron durante 18 horas con MDPK67b (0.06  $\mu$ M solo o MDPK67b (0.06  $\mu$ M) más concentraciones crecientes de Etopósido (en  $\mu$ g/ml) como se indica o PBS. Los porcentajes de neutrófilos que expresan alto CD16 se evaluaron mediante análisis FACS.

Conclusión: Incluso dosis altas (hasta 125  $\mu$ g/ml) del fármaco citostático Etopósido sólo bloquea parcialmente la apoptosis reduciendo el efecto de MDPK67b.

**Ejemplo 6: Análisis RT-PCR de la expresión KLK en líneas celulares leucémicas y células mononucleares y neutrófilos derivados de donantes.**

**Materiales y Métodos:**

Las líneas de células DU-145, PC-3, T47D, OVCAR-3, HL-60, THP1 y U937 se cultivaron en medios estándar adecuados con 10% de suero de ternero fetal desactivado e incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se aislaron células mononucleares y neutrófilos. El ARN total se extrajo de las células usando reactivo Trizol (Life Technologies, Inc.) y PureLink Micro- para -Midi kit (Invitrogen) y dos  $\mu$ g de ARN total se inverso-transcribieron en la primera cadena de ADNc usando Superscrip III (Invitrogen) en una reacción de 20  $\mu$ l siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron usando iniciadores específicos para cada caliceína y actina como control. Todos los iniciadores ya se describieron en la literatura (Harvey TJ y otros, J Biol Chem, 1 diciembre 2000 ;275(48):37397-406. Yousef GM y otros, J Biol Chem. ene 5 de 2001;276 (1):53-61. Yousef GM y otros, Cancer Res. abril 15 de 2001;61(8):3425-31). Dependiendo de la reacción de PCR, el ARN aislado a partir de diferentes líneas celulares que incluyen DU-145, PC-3, T47D, OVCAR-3 se usaron como controles positivos para la expresión de KLK (Harvey TJ y otros, J Biol Chem, 2000 Dec 1;275(48):37397-406).

Las condiciones de los ciclos fueron dependiendo del gen objetivo y principalmente como se describe en Harvey TJ y otros, (J Biol Chem, 1 dic. 2000;275(48):37397-406). La mezcla de PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% y

se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Donde se indique, las bandas de ADN del tamaño predicho se escindieron a partir de un segundo gel de agarosa al 2% a continuación de la electroforesis y se secuenció el ADN recuperado.

- 5 Los iniciadores se usaron para la amplificación de KLK por RT-PCR;

ES 2 534 832 T3

KLK	INICIADOR	Secuencia
KLK1	KLK1 F	TGGAGAACCACACCCGCCAAG
	KLK1R	ACGGCGACAGAAGGCTTATTG
KLK2	KLK2F	GCCTAAAGAAGAATAGCCAGGT
	KLK2R	CTCAGACTAAGCTCTAGCACAC
KLK3	KLK3 F	GCATCAGGAACAAAAGCGTGA
	KLK3R	CCTGAGGAATCGATTCTTCAG
KLK4	KLK4F	GCGGCACTGGTTCATGGAAAAGG
	KLK4R	CAAGGCCCTGCAAGTACCCG
KLK5	KLK25 F	GAGCTGGGGCCGGGGAAGAC
	KLK5R	TGGGCCGGGCACAAGGGTAA
KLK6	KLK6F	GAGCGGCCATGAAGAAGC
	KLK6R	AATCACCATCTGCTGTCTTGC
KLK7	KLK7F	GCCCAGGGTGACAAGATTATT
	KLK7R	GTACCTCTGCACACCAACGG
KLK8	KLK8 F	TACTCTGTGGCGGTGCCTTG
	KLK8R	GAGCCCCAGGATGTGATGCC
KLK9	KLK9F	GGCCGGCCTCTCCACCTTAC
	KLK9R	GCGCGGGCTCAGTTCTCCAT
KLK10	KLK10 F	GCGGAAACAAGCCACTGTGGG
	KLK10R	GGTAAACACCCACGAGAGGA
KLK11	KLK11 F	CCGCTACATAGTTCACCTGG
	KLK11R	AGGTGTGAGGCAGGCGTAACT
KLK12	KLK12 F	TGGCAGACAAAGAGACAAGGT
	KLK12R	CTTAGAAGGGCTGGCAGGAG
KLK13	KLK13 F	CTACACCTGCTTCCCCACTCTCA
	KLK13R	GCCGGTCAGGTTGCCACAT
KLK14	KLK14 F	CTGGGCAAGCACAACTGAG
	KLK14R	GCATCGTTTCCTCAATCCAGC
KLK15	KLK15 F	CAAGTGGCTCTCTACGAGCG
	KLK15R	ATCACACGGGTGGTCATGTG

55

Resultados

Tabla 2: Patrones de expresión de los 15 genes de KLK obtenidos mediante análisis de RT-PCR en líneas celulares leucémicas y células neutrófilos y mononucleares derivadas de los donantes. Los siguientes símbolos usados representan: ++, expresión moderada/alta ; + expresión baja; (1) Productos de PCR del tamaño previsto secuenciado y confirmado que es la secuencia correcta.

	HL60	THP1	U937	Mononuclear	Neutrófilo
KLK1	++	++ <sup>1)</sup>		++ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>
KLK2	+	+	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	
KLK3					
KLK4					
KLK5				+	
KLK6					
KLK7					
KLK8			+		+
KLK9			++		
KLK10		+			
KLK11		+	+		
KLK12	+	+	+	+	++
KLK13	+ <sup>1)</sup>	++			
KLK14	++		+	++	
KLK15			+		

Conclusión:

El análisis de RT-PCR de los niveles de expresión de KLK en líneas celulares leucémicas y células aisladas de sangre humana indicó que múltiples KLKs se expresan y que las diferentes células tienen muy diversos patrones de expresión de la familia de la proteasa KLK. Tales diferencias en los niveles de expresión de KLK pueden involucrarse en diferentes efectos de inhibidores de calicreína que tienen en los cultivos in vitro de estas células como la protección descrita contra la apoptosis en las células de neutrófilos.

LISTADO DE SECUENCIAS

Variantes ACT de la secuencia de ADN : MD 820  
 Sec. con núm. de ident. 1

5  
 10  
 15  
 20  
 25

**ATG**GAGAGGAT**CCCATCACCATCACCATCAC**TCTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGA  
 GAATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCA  
 ACGTGGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTC  
 ATCTTCTCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATAC  
 CACCCTGACAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAA  
 TTCACCAGAGCTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTG  
 AGTATGGGAAATGCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACCGGAGGA  
 TGCCAAGAGGCTGTATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTA  
 AGAAGCTCATCAACGACTACGTGAAGAATGGAAC TAGGGGGAAAA TCACAGATCTGATCAAG  
 GACCTTGACTCGCAGACAATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTAAAGCCAAATGGGA  
 GATGCCCTTTGACCCCAAGATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGG  
 TAAATGGTGCCCATGATGAGTTTGTCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTG  
 TCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAGTACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGA  
 TCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAAGCCATGCTGCTCCAGAGACCCCTGAAGCGGTGGAGAG  
 ACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGAGCTCTACCTGCCAAAGTTTCCATCTCGAGGGAC  
 TATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTGGGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGA  
 CCTGTGAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAGCAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGC  
 TTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGCTGCCACCGCGGTCAAAAATCACCCCTCCGT  
 TCTCGAGCAGTGGAGACCGTACCATTGTGCGTTTCAACAGGCCCTTCTGATGATCATTGT  
 CCTTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAGTCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Variantes ACT de la Secuencia de Proteína: MD 820  
 Sec. con núm. de ident.2

35  
 40

**MRGSHHHHHH**SRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAF'SLYKQLVLKAPDKNV  
 IFSPLSISTALAFSLGHNHTLLEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNOSSDELQL  
 SMGNAMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNTRGKITDLIK  
 DLDSQTMMLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTIPYFRDEEL  
 SCTVVELKYTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISR  
 YNLNDILLQLGIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVKAVLDVFEEGTEASAATAVKITLR  
SRAVETRTIVRFNRPFMLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA\*

45

Cursiva: Codón de iniciación ATG  
 Negritas: His-tag  
 Subrayado: Mutación de ADN  
 Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación RSL.

Variante ACT secuencia de ADN : MD 62  
 Sec. con núm. de ident.3

5

**ATG**AGAGAGGATCC**CATCACCATCACCATCAC**TCTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGA  
 GAATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCA  
 ACGTGGACTTCGCTTTT**CAGCCTGTACAAGCAGTTAGT**CCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTC  
 ATCTTCTCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATAC  
 CACCCTGACAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAA

10

15

20

25

TTCACCAGAGCTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTG  
 AGTATGGGAAATGCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACCGGAGGA  
 TGCCAAGAGGCTGTATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTA  
 AGAAGCTCATCAACGACTACGTGAAGAAATGGAAGTGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAG  
 GACCTTGACTCGCAGACAATGATGGTCTTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGA  
 GATGCCCTTTGACCCCCAAGATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGG  
 TAATGGTGCCCATGATGAGTTTGCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTG  
 TCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAGTACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGA  
 TCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAGCCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAG  
 ACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGAGCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGAC  
 TATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTGGGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGA  
 CCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAGCAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGC  
 TTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGCTGCCACCGCGGTCAAATCAC**AGGAGG**  
 TCTATCGATGTGGAGACCGGTACCATTGTGCGTTTTCAACAGGCCCTTCTGATGATCATTGT  
 CCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAGTACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Variante ACT secuencia de proteína : MD 62  
 Sec. con núm. de ident.4

30

35

40

**MRGSHHHHHH**SRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNV  
 IFSPLSISTALAFSLGAHNTTLEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRLTNQSSDELQL  
 SMGNAMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIK  
 DLDSQTMMLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPYFRDEEL  
 SCTVVELKYTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSELEFREIGELYLPKFSISRD  
 YNLNDILLQLGIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKITRR  
SIDVETRTIVRFNRPFMLMIVPTDTQNIFFMSKVTPKQA\*

Cursiva: Codón de iniciación ATG  
 Negritas: His-tag  
 Subrayado: Mutación de ADN  
 Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación RSL.

45

Variante ACT secuencia de ADN: MD 83  
 Sec. con núm. de ident. 5

5 **ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACT**CTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGA  
 GAATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCA  
 ACGTGGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTC  
 ATCTTCTCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGCTCTGGGGGCCATAATAC  
 10 CACCCTGACAGAGATTCTCAAAGGCCCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAA  
 TTCACCAGAGCTTCCAGCACCTCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTG  
 AGTATGGGAAATGCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGGAGGA  
 TGCCAAGAGGCTGTATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTA  
 AGAAGCTCATCAACGACTACGTGAAGAATGGAAC TAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAG  
 15 GACCTTGACTCGCAGACAATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGA  
 GATGCCCTTTGACCCCCAAGATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAGTGGG  
 TAATGGTGCCCATGATGAGTTTGCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTG  
 TCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAGTACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCTCCCTGA  
 TCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAAGCCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAG  
 20 ACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGAGCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGAC  
 TATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTGGGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGA  
 CCTGTCAGGGATCACAGGGCCAGGAACCTAGCAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGC  
 TTGATGATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGCTGCCACCGCGGTCAAAATCAGGGGGAGA  
 TCTGAGTTAGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTCAACAGGCCCTTCTGATGATCATTGT  
 25 CCTACAGACACCCAGAATCTTCTTCATGAGCAAAGTCACCAATCCAAGCAAGCCTAA

Variante ACT secuencia de proteína : MD 83  
 sec. con núm. de ident.6

30 MRGSHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNV  
 IFSPLSISTALAFSLGAHNNTLTELKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRLNLNQSDELQL  
 SMGNAMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNTRGKITDLIK  
 35 DLDSQTMMLVNVYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKVVMPMMSLHHLTIPYFRDEEL  
 SCTVVELKYTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISR  
 YNLNDILLQLGIEEAFSTKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKIRGR  
 SELVETRTRIVRFNRPFMLIIVPTDQNIFFMSKVTNPKQA\*

40 Cursiva: Codón de iniciación ATG  
 Negritas: His-tag  
 Subrayado: Mutación de ADN  
 Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación RSL.

Variante ACT secuencia de ADN: MD 67  
 sec. con núm. de ident.7

5 **ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACC**TCTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGA  
 GAATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCA  
 ACGTGGACTTCGCTTTTCCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTC  
 10 ATCTTCTCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATAC  
 CACCCTGACAGAGATTCTCAAAGGCCCAAGTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAA  
 TTCACCAGAGCTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTG  
 AGTATGGGAAATGCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACCGGAGGA  
 TGCCAAGAGGCTGTATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTA  
 15 AGAAGCTCATCAAGACTACGTGAAGAATGGAAGTGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAG  
 GACCTTGACTCGCAGACAATGATGGTCCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGA  
 GATGCCCTTTGACCCCAAGATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGG  
 TAATGGTGGCCCATGATGAGTTTGCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTG  
 TCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAGTACACAGGCAATGCCAGCGCACTTTCATCCTCCCTGA  
 20 TCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAAGCCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAG  
 ACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGAGCTTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGAC  
 TATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTGGGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGA  
 CCTGTGAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAGCAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAAGGCTGTGC  
 TTGATGATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGCTGCCACCGCGGTCAAATCAAGCTTAGA  
 25 ACAACATTAGTGGAGACCGCTACCATTGTGCGTTTCAACAAGGCCCTTCTCTGATGATCATTGT  
 CCTACAGACACCAGAATCTTCTTCATGAGCAAAGTCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Variante ATC de la secuencia de proteína: MD 67  
 Sec. con núm. de ident. 8

30 MRGSHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAF SLYKQLVLKAPDKNV  
 IFSPLSISTALAFLSLGAHNNTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRLTNQSSDELQL  
 SMGNAMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNTRGKITDLIK  
 35 DLDSQTMMLVNYIFPKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTI PYFRDEEL  
 SCTVVELKYTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISR  
 YNLNDILLQLGIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKIKLR  
TTLVETRITIVRFNRPFMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA\*

40 Cursiva: Codón de iniciación ATG  
 Negritas: His-tag  
 Subrayado: Mutación de ADN  
 Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación RSL.

Variante ACT secuencia de ADN: MD 61  
 Sec. con núm. de ident.9

5 **ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCAC**TCTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGA  
 GAATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCA  
 ACGTGGACTTCGCCTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTC  
 10 ATCTTCTCCCACGTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATAC  
 CACCCTGACAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAA  
 TTCACCAGAGCTTCCAGCACCTCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTG  
 AGTATGGGAAATGCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACCGGAGGA  
 TGCCAAGAGGCTGTATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTA  
 15 AGAAGCTCATCAACGACTACGTGAAGAATGGAACTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAG  
 GACCTTGACTCGCAGACAATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGA  
 GATGCCCTTTGACCCCAAGATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGG  
 TAATGGTCCCATGATGAGTTTGCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTG  
 TCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAGTACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGA  
 TCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAAGCCATGCTGCTCCCAGAGACCTGAAGCGGTGGAGAG  
 20 ACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGAGCTCTACCTGCCAAAGTTTTCATCTCGAGGGAC  
 TATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTGGGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGA  
 CCTGTCAGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAGCAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGC  
 TTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGCTGCCACCGCGGTCAAAATCATGACAAGA  
 TCTA**ACGC**AGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTCAACAGGCCCTTCTGATGATCATTGT  
 25 CCTACAGACACCCAGAACA**TCT**TCTTCATGAGCAAAGTCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Variante ACT secuencia de proteína: MD 61  
 Sec. con númde ident.:10

30 MRGSHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNV  
 IFSPLSI STALAFSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRRLTNQSSDELQL  
 SMGNAMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNRTRGKITDLIK  
 DLDSQTMMLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTI PYFRDEEL  
 SCTVVELKYTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRD  
 35 YNLNDILLQLGIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKIMTR  
SNAVETRTIVRFNRPFLLMIIVPTDTONIFFMSKVTPKQA\*

Itálica: Codón de iniciación ATG  
 Negritas: His-tag  
 40 Subrayado: Mutación de ADN  
 Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación RSL.

Variantes ACT de la secuencia de ADN : MD 518  
 Sec. con núm. de ident. 11

5 **ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACT**CTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGA  
 GAATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCA  
 ACGTGGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTC  
 10 ATCTTCTCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATAC  
 CACCTGACAGAGATTCTCAAAGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAA  
 TTCACCAGAGCTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTG  
 AGTATGGGAAATGCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGA  
 TGCCAAGAGGCTGTATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTA  
 15 AGAAGCTCATCAACGACTACGTGAAGAATGGAAC TAGGGGGAAAAATCACAGATCTGATCAAG  
 GACCTTGACTCGCAGACAATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTAAAGCCAAATGGGA  
 GATGCCCTTTGACCCCAAGATACTCATCAGTCAAGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGG  
 TAATGGTGGCCATGATGAGTTTGCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTG  
 TCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAGTACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGA  
 TCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAAGCCATGCTGCTCCCAGAGACCC TGAAGCGGTGGAGAG  
 20 ACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGAGCTCTACCTGCCAAAGTTT TCCATCTCGAGGGAC  
 TATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTGGGCATTGAGGAAGCCTT CACCAGCAAGGCTGA  
 CCTGTGAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAGCAGTCTCCAGGTGG TCCATAAGGCTGTGC  
 TTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGCTGCCACCGCGGTC AAAATCACCGAGCGT  
GTCTCGCCCGTGGAGAGCGGTACCATTTGTGCGTTTCAACAGGCCCTTCTGATGATCATTTGT  
 25 CCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAGTCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Variantes ACT de la secuencia de proteína : MD 518  
 Sec. con núm. de ident.12

30 **MRGSHHHHHH**SRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNV  
 IFSPLSISTALAFLSLGAHNTTLEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNLQSSDELQL  
 SMGNAMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNRTRGKITDLIK  
 DLDSQTMMLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKVVMPMMSLHHLTIPYFRDEEL  
 SCTVVELKYTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSELEFREIGELYLPKFSISR  
 35 YNLNDILLQLGIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKI TER  
VSEVETRTIVRFNRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA\*

Italica: Codón de iniciación ATG  
 Negritas: His-tag  
 40 Subrayado: Mutación de ADN  
 Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación RSL.

Variantes ACT de la secuencia de ADN: MDCI  
 Sec. con núm. de ident.13

5 **ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACT**CTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGA  
 GAATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCA  
 ACGTGGACTTCGCTTTTCAGCCTGTACAAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTC  
 ATCTTCTCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATAC  
 10 CACCCTGACAGAGATTCTCAAAGGCCCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAA  
 TTCACCAGAGCTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTG  
 AGTATGGGAAATGCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACACGGAGGA  
 TGCCAAGAGGCTGTATGGCTCCGAGGCCCTTGGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTA  
 AGAAGCTCATCAACGACTACGTGAAGAATGGAAC TAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAG  
 15 GACCTTGACTCGCAGACAATGATGGTCTGGTGAATTACATCTCTTTAAAGCCAAATGGGA  
 GATGCCCTTTGACCCCAAGATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAGTGGG  
 TAATGGTGGCCATGATGAGTTGCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTG  
 TCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAGTACACAGGCAATGCCAGCGCACTTTCATCCTCCCTGA  
 TCAAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAGCCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAG  
 ACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGAGCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGAC  
 20 TATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTGGGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGA  
 CCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAGCAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGC  
 TTGATGATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGCTGCCACCGCGGTCAAATCACCTTTAGGA  
 TCTGCATTAGTGGAGACCGGTACCATTGTGCGTTTCAACAGGCCCTTCTGATGATCATTGT  
 CCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAGTCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Variantes ACT de la secuencia de proteína : MD CI  
 Sec. con núm. de ident.14

30 **MRGSHHHHHHSRHPNS**PLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNV  
 IFSPLSISTALAFSLGAHNTTLEILKGLKFNLTETSEAEIHQS FQHLLRTL NQSSDELQL  
 SMGNAMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIK  
 DLDSQTMMLVNYIFFKAKWEMFPDPQDTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTIPYFRDEEL  
 SCTVVELKYTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSELEFREIGELYLPKFSISR  
 35 YNLNDILLQLGIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKITFR  
 SALVETRTIVRFNRPFMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA\*

Secuencia de ADN de MDPK67b

Sec. con núm. de ident.15

5  
 ATGCATCCGAACAGCCCGCTGGATGAAGAAAACCTGACCCAGGAAAACCAGGATCGCGGCAC  
 CCATGTGGATCTGGGTCTGGCCAGCGCGAACGTGGATTTTTCGCTTCAGCCTGTATAAACAGC  
 TGGTGTGAAAGCGCCGGATAAAAAACGTGATTTTTAGCCCGCTGTCTATTAGCACCGCGCTG  
 10 GCCTTTCTGAGCCTGGGCGCGCATAACACCACCTGACCGAAATTCGAAAGGCCTGAAATT  
 TAACCTGACCGAAACCAGCGAAGCGGAAATTCATCAGAGCTTTCAGCATCTGCTGCGTACCC  
 TGAACCAGAGCAGCGATGAACTGCAGCTGTCTATGGGCAACCGCATGTTTGTGAAAGAACAG  
 CTGTCTCTGCTGGATCGTTTTACC GAAGATGCGAAACGTCTGTATGGCAGCGAAGCGTTTGC  
 15 GACCGATTTTCAGGATAGCGCGCGGCGAAAAAACTGATTAACGATTATGTGAAAAACGGCA  
 CCGGTGGCAAAAATTACCGATCTGATCAAAGATCTGGATAGCCAGACCATGATGGTGTGCTGGTG  
 AACTACATCTTCTTCAAAGCGAAATGGGAAATGCCGTTTGATCCGCAGGATACCCATCAGAG  
 CCGTTTTTACCTGAGCAAAAAAAAATGGGTGATGGTGCCGATGATGAGCCTGCATCATCTGA  
 CCATTCCGTATTTTCGTGATGAAGAAGTGCACCGTGGTGGAACTGAAATATAACCGC  
 AACCGAGCGCGCTGTTTATTCTGCCGGATCAGGATAAAAATGGAAGAAGTGAAGCGATGCT  
 20 GCTGCCGAAACCCTGAAACGTTGGCGTGATAGCCTGGAATTTTCGTGAAATTGGCGAAGTGT  
 ATCTGCCGAAATTTAGCATTAGCCGCGATTATAACCTGAACGATATTCTGCTGCAGCTGGGC  
 ATTGAAGAAGCGTTTACCAGCAAAGCGGATCTGAGCGGCATTACCGGTGCGCGTAACCTGGC  
 CGTGAGCCAGGTGGTGCATAAAGCGGTGCTGGATGTGTTTGAAGAAGGCACCGAAGCGAGCG  
 25 CGCGACCGCGGTGAAAATTAACCTGCGTACCACCTGGTGGAAACCGTACCATTGTGCGT  
 TTTAACCGTCCGTTTCTGATGATTATTGTGCCGACCGATACCCAGAACATCTTTTTTCATGAG  
 CAAAGTGACCAATCCGAAACAGGCGTAA

Secuencia de aminoácido de MDPK67b

Sec. con núm. de ident. 16

35  
 MHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIFSPLSISTAL  
 AFLSLGAHNNTLLEILKGLKFNLTETSEAEIHQS FQHLLRTL NQSSDELQLSMGNAMFVKEQ  
 40 LSLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNGTGKIDLIKDLDSQTMMLV  
 NYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELKYTG  
 NASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQLG  
 IEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKIKLRTTLVETRTIVR  
 45 FNRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTPKQA

Cursiva: Codón de iniciación ATG

Negritas: His-tag

Subrayado: Mutación de ADN

45 Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación RSL.

Secuencia de ADN de ACT-G9 (nombres alternativos: MDOKG9, OKDG9)  
 Sec. con núm. de ident.17

5 **ATG****GAGGATCC****CATCACCATCACCATCAC****TCTAGACACCCTAACAGCCCAC****TGACGAGGA**  
 GAATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCA  
 ACGTGGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTC  
 ATCTTCTCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTTGGGGGCCATAATAC  
 CACCCCTGACAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAA  
 10 **TTCACCAGAGCTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTG**  
 AGTATGGGAAATGCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGTGGACAGGTTACAGGAGGA  
 TGCCAAAGAGGCTGTATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTA  
 AGAAGCTCATCAACGACTACGTGAAGAATGGAAGTGGGGGAAAATCAGATCTGATCAAG  
 GACCTTGACTCCGAGACAATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGA  
 15 **GATGCCCTTTGACCCCAAGATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGG**  
 TAATGGTGCCCATGATGAGTTTGCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTG  
 TCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAGTACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGA  
 TCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAAGCCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAG  
 ACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGAGCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGAC  
 20 **TATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTGGGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGA**  
**CCTGTGAGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAGCAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGC**  
**TTGATGATTTGAGGAGGCACAGAAAGCATCTGCTGCCACGGCGTCAAAAACCGTTGACTAG**  
**GCTGCTTGGTGGAGACCGTACCATTGTGCGTTTTCAACAGGCCCTTCTGATGATCATTGT**  
**CCCTACAGACCCAGAATCTTCTCATGAGCAAAGTACCAATCCCAAGCAAGCCTAA**

25 Cursiva y en negrita: Codón de iniciación ATG  
 Negrita y subrayado: His-tag  
 Subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)  
 Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación RSL.

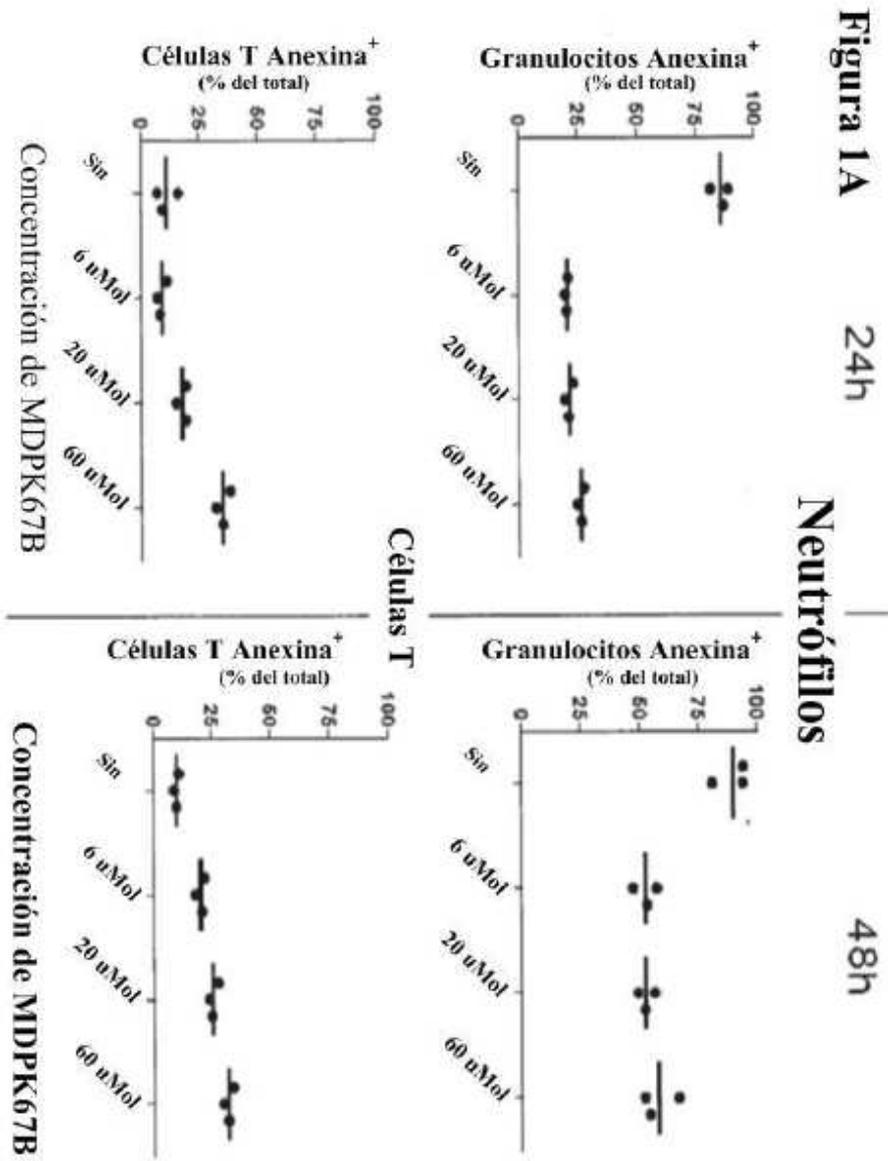
30 Secuencia de aminoácido de: ACT-G9 (nombres alternativos: MDOKG9, OKDG9)  
 Sec. con núm. de ident.18

35 **MRGSHHHHH****SRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVVKAPDKNV**  
**IFSPLSISTALAFLSLGAHNTTLEILKGLKFNLTETSEAEIHQS FQHLLRRLNLQSSDELQL**  
**SMGNAMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKINDYVKNNGTRGKITDLIK**  
**DLDSQTMMLVNYIFFKAKWEMFPDPQDTHQSRFYLSKKKVVMPMMSLHHLTI PYFRDEEL**  
**SCTVVELKYTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISR**  
 40 **YNLNDILLQLGIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKTVDY**  
**ÄALVETRTIVRFNRPFLMIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA\***

45 Cursiva y negrita: Metionina del comienzo  
 Negrita y subrayado: His-tag  
 Subrayado: mutación de aminoácido (añadido)  
 Subrayado y gris: mutación RSL

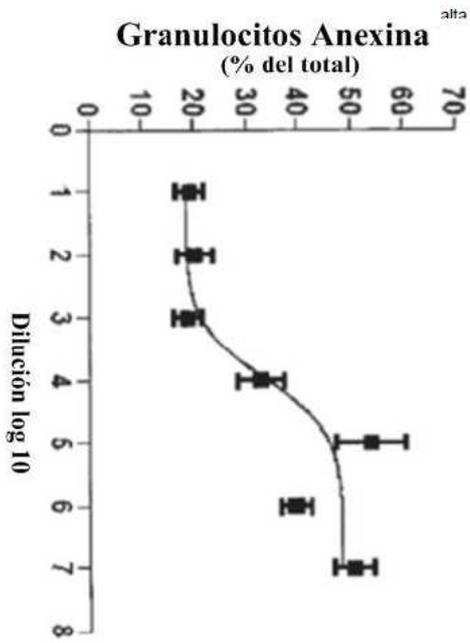
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Inhibidor de serina proteasa que consiste en un inhibidor de calicreína seleccionado del grupo que consiste en sec. con núm. de ident. 2, sec. con núm. de ident. 4, sec. con núm. de ident. 6, sec. con núm. de ident. 8, sec. con núm. de ident. 10, sec. con núm. de ident. 12, sec. con núm. de ident. 14, sec. con núm. de ident. 16, sec. con núm. de ident. 18 o mezclas de estas, para usar en un método para tratar o prevenir la neutropenia en pacientes que la desarrollan debido a infecciones, septicemia, quimioterapia, irradiación, productos químicos tóxicos o como efectos secundarios de cualquier medicamento.
- 10 2. Inhibidores de serina proteasa para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho método para el tratamiento o la prevención de la neutropenia comprende tratar o prevenir las úlceras de la piel en pacientes con diabetes en el que los neutrófilos experimentan la muerte celular, o las úlceras de la piel se desarrollan en pacientes con enfermedad arterial periférica asociada con condiciones de hipoxia en la piel y disfunción de los neutrófilos y apoptosis.
- 15 3. Inhibidores de serina proteasa para usar de acuerdo con la reivindicaciones 1-2, en donde dicho método para el tratamiento o la prevención de la neutropenia comprende tratar o prevenir el daño inducido por irradiación de células mieloides como ocurre en el curso del tratamiento de malignidad, accidentes en plantas nucleares o uso de armas nucleares.
- 20 4. Estuche para el tratamiento o la prevención de la neutropenia en un mamífero que la desarrolla debido a infecciones, septicemia, quimioterapia, irradiación, productos químicos tóxicos o como efectos secundarios de cualquier medicamento, caracterizado porque dicho estuche comprende un inhibidor de serina proteasa para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso.
- 25 5. Estuche para usar de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el inhibidor de serina proteasa comprende una etiqueta detectable o pueden unirse a una etiqueta detectable para formar un complejo detectable.

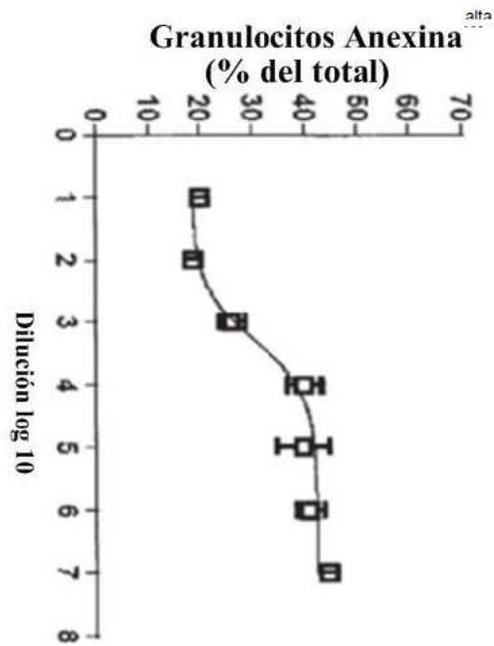


# Figura 1b

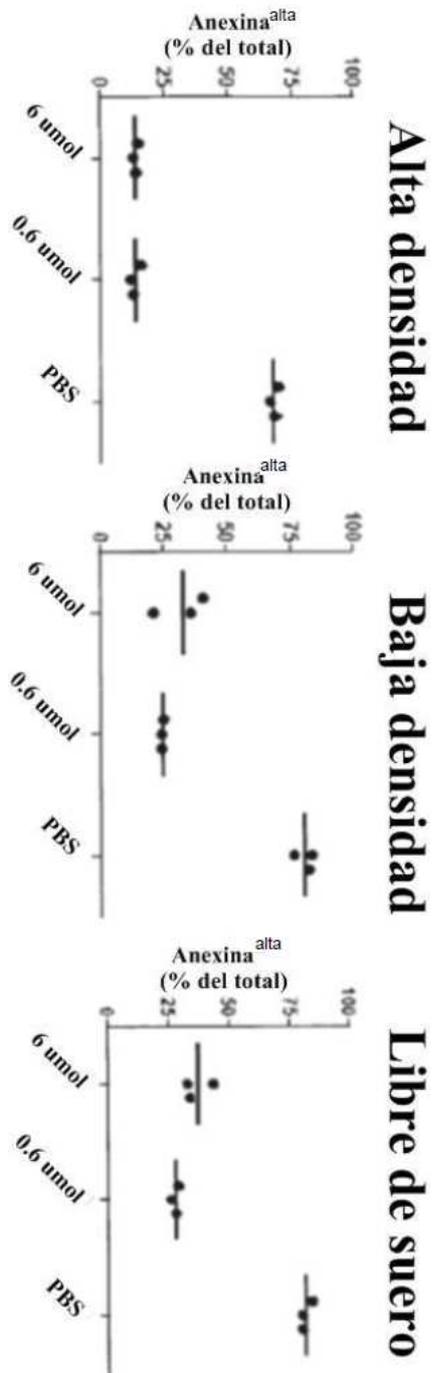
## Titulación de MDPK67b



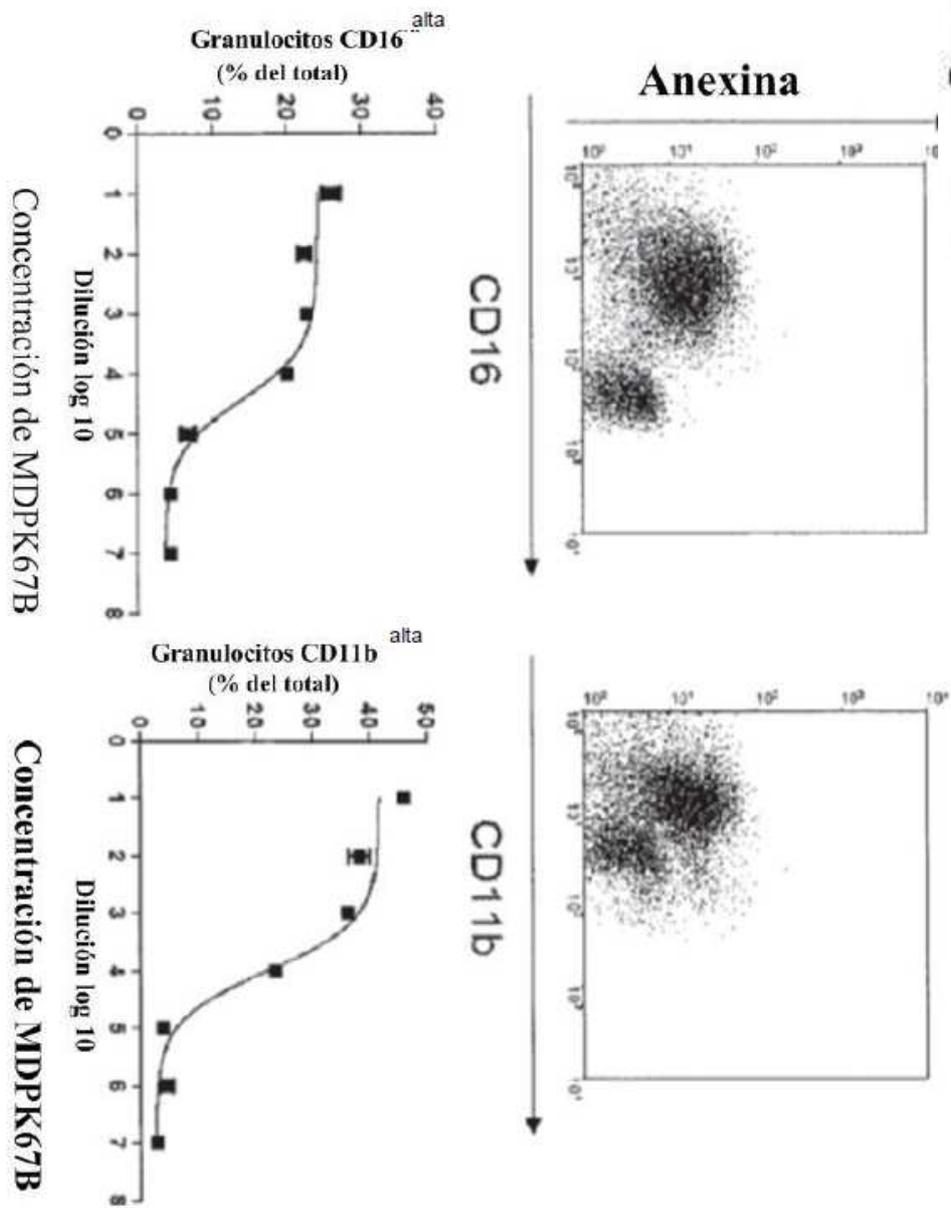
## Titulación de OKDG9



**Figura 2**



**Figura 3a**



**Figura 3b**

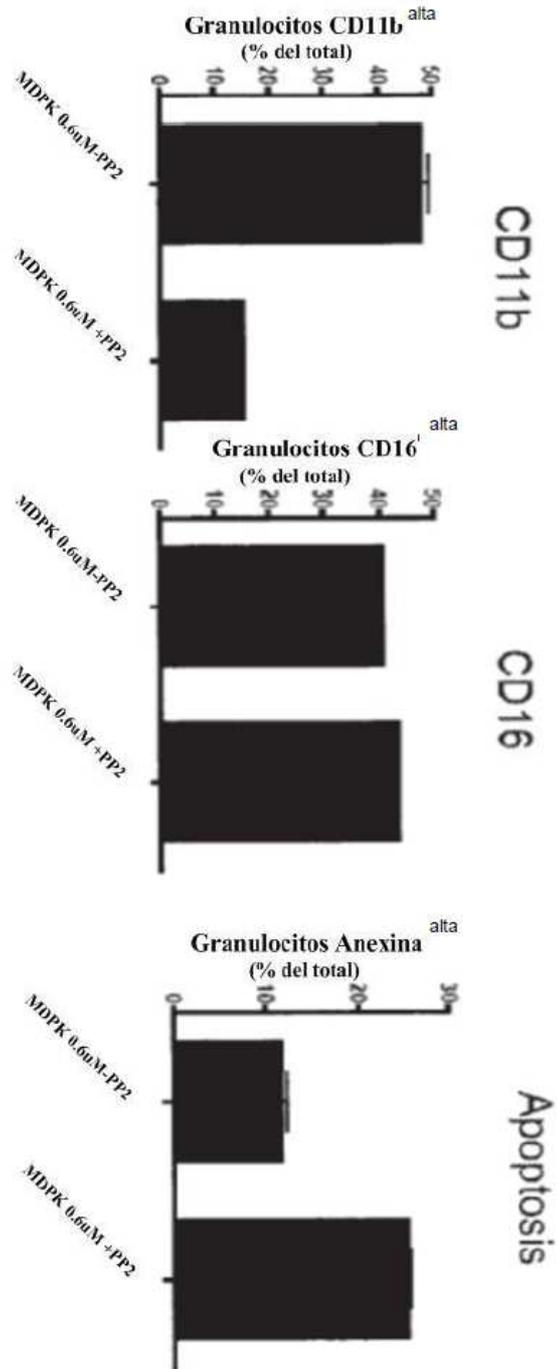
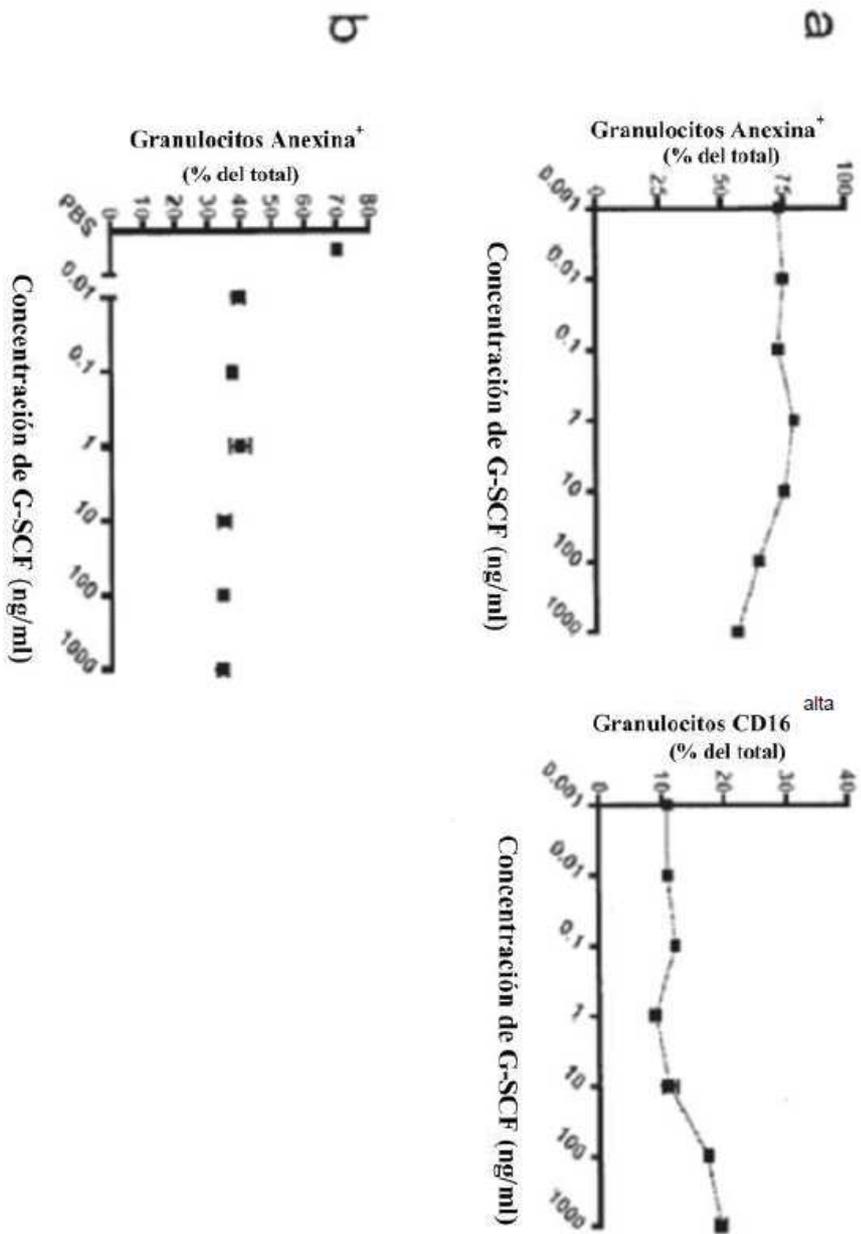


Figura 4



**Figura 5**

