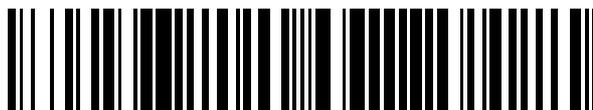


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 927**

51 Int. Cl.:

A61K 38/55 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2003 E 10180486 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2298278**

54 Título: **Prevención y reducción de pérdida de sangre y respuesta inflamatoria**

30 Prioridad:

07.06.2002 US 387239 P

28.08.2002 US 407003 P

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

16.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LADNER, ROBERT, CHARLES y
LEY, ARTHUR, C.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 559 927 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

Prevención y reducción de pérdida de sangre y respuesta inflamatoria

Solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° 60/387.239, presentada el 7 de junio de 2.002 y la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° 60/407.003, presentada el 28 de agosto de 2.002.

Las explicaciones completas de las solicitudes anteriores se incorporan en la presente memoria por referencia.

Antecedentes de la invención

10 Las proteasas están implicadas en un amplio intervalo de rutas biológicas. En particular, las serina proteasas tales como calicreína, plasmina, elastasa, activador del plasminógeno urocinasa, trombina, inhibidor de coagulación asociada a lipoproteína humana y factores de coagulación tales como los factores VIIa, IXa, Xa, XIa y XIIa se han implicado en rutas que afectan al flujo sanguíneo, por ejemplo, isquemia general y focal, invasión de tumores, fibrinólisis, pérdida de sangre perioperativa e inflamación. Los inhibidores de las serina proteasas específicas, por lo tanto, han recibido atención como potenciales objetivos de fármacos para diversas enfermedades isquémicas.

15 Uno de tales inhibidores, la aprotinina (también denominada inhibidor de tripsina pancreática bovina o BPTI, por sus siglas en inglés), obtenido de pulmón bovino, ha sido homologado en los Estados Unidos para uso profiláctico en la reducción de pérdida de sangre perioperativa y la necesidad de transfusión en pacientes que experimentan derivación cardiopulmonar (CPB, por sus siglas en inglés), por ejemplo, durante un procedimiento de injerto de derivación de arterias coronarias. La aprotinina está comercialmente disponible con el nombre comercial TRASYLOL[®] (Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut) y se homólogo previamente
20 para uso para tratar la pancreatitis. La eficacia de la aprotinina está asociada a sus capacidades relativamente no específicas para inhibir una variedad de serina proteasas, incluyendo calicreína y plasmina del plasma. Estas proteasas son importantes en una serie de rutas del sistema de activación por contacto (CAS, por sus siglas en inglés).

25 El CAS se activa inicialmente cuando la sangre completa se pone en contacto con la superficie de sustancias extrañas (por ejemplo, caolín, vidrio, sulfato de dextrano o superficies óseas dañadas). La calicreína, una serina proteasa, es una enzima plasmática que inicia la cascada del CAS que conduce a la activación de neutrófilos, plasmina, coagulación y diversas cininas. La calicreína es segregada como un zimógeno (pre-calicreína) que circula como una molécula inactiva hasta que se activa por un suceso proteolítico temprano en la cascada de activación por
30 contacto. Claramente, la inhibición específica de calicreína sería una propuesta muy atractiva para controlar la pérdida de sangre asociada a CPB y el comienzo de la respuesta inflamatoria sistémica (SIR, por sus siglas en inglés) como se encontraría durante, por ejemplo, diversos procedimientos quirúrgicos invasivos.

A pesar de ser el único compuesto autorizado para evitar la pérdida de sangre perioperativa en CPB para
35 procedimientos de injerto de derivación de arterias coronarias (CABG, por sus siglas en inglés), la aprotinina no se usa tan ampliamente como se esperaría. Hay serias preocupaciones con respecto al uso de este polipéptido bovino en pacientes que requieren CPB, y en particular el uso de este compuesto en procedimientos de CABG. La aprotinina no es específica de calicreína, pero interactúa con enzimas adicionales (por ejemplo, plasmina) en múltiples rutas. Así, el mecanismo de acción de la aprotinina es muy especulativo y la ausencia de entendimiento preciso de lo que se ve afectado durante el tratamiento de aprotinina produce el riesgo de complicaciones durante el
40 tratamiento. Una complicación citada con frecuencia es la trombosis no controlada, debido a acciones de la aprotinina en la ruta fibrinolítica. Hay preocupación no sólo sobre tales casos hiperagudos como trombosis de vasos principales en el periodo perioperativo sino también sobre permeabilidad del injerto después del procedimiento CABG. Además, como una proteína que se encuentra en la naturaleza obtenida de pulmón bovino, la administración de aprotinina en seres humanos puede provocar intensa hipersensibilidad o reacciones anafilácticas o anafilactoides
45 después de la primera y, con más frecuencia, después de la administración repetida a pacientes. Esto es una preocupación en particular en el gran número de pacientes que presentan procedimientos de CABG repetidos. Además, hay una creciente preocupación pública con respecto al uso de material procedente de fuentes bovinas como un vector potencial para la transmisión de encefalopatía esponjiforme bovina a seres humanos.

50 Estas preocupaciones hacen evidente que queda la necesidad de medios y métodos más eficaces y más específicos para prevenir o reducir la pérdida de sangre perioperativa y el comienzo de SIR en un paciente sometido a cirugía dando como resultado la activación del CAS, tal como los procedimientos de CABG en pacientes de CPB, o artroplastia de cadera.

Sumario de la invención

55 La presente invención se define por las reivindicaciones. Esta invención se basa en el descubrimiento de péptidos que inhiben las serina proteasas. Las serina proteasas tales como, por ejemplo, calicreína, están implicadas en, por ejemplo, las rutas que conducen a excesiva pérdida de sangre perioperativa y el comienzo de respuesta inflamatoria

sistémica. Los inhibidores peptídicos de calicreína preferidos incluyen los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 6.333.402 y 6.057.287 a Markland et al. La invención se refiere en parte al uso de los péptidos en métodos terapéuticos y composiciones adecuadas para uso en la eliminación o reducción de diversas isquemias, incluyendo pero no limitado a, pérdida de sangre perioperativa y el comienzo de respuesta inflamatoria sistémica. La pérdida de sangre perioperativa resulta de procedimientos quirúrgicos invasivos que conducen a activación por contacto de componentes de complemento y los sistemas coagulación/fibrinólisis. Más específicamente, la invención proporciona los inhibidores de calicreína reivindicados para uso en la reducción o prevención de pérdida de sangre perioperativa y una respuesta inflamatoria sistémica en pacientes, por ejemplo, sometidos a procedimientos quirúrgicos invasivos, especialmente cirugías cardiorácicas.

5 En una instancia, la descripción se refiere a un método para prevenir o reducir la isquemia en un paciente que comprende administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19
 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly
 15 Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54
 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEC ID N° 1), en la que Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 o Xaa58 son cada uno
 individualmente un aminoácido o está ausente; Xaa10 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en:
 Asp y Glu; Xaa11 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala y Thr;
 Xaa13 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys y Gln;
 20 Xaa15 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn y Gln; Xaa16 es
 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Gly, Ser, Asp y Asn; Xaa17 es un aminoácido
 seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln y Thr; Xaa18 es un aminoácido
 seleccionado del grupo que consiste en: His, Leu, Gln y Ala; Xaa19 es un aminoácido seleccionado del grupo que
 consiste en: Pro, Gln, Leu, Asn e Ile; Xaa21 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Trp, Phe,
 25 Tyr, His e Ile; Xaa22 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe; Xaa23 es un aminoácido
 seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe; Xaa31 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste
 en: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile y Thr, Xaa32 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste
 en: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly y Val; Xaa34 es un aminoácido seleccionado del grupo que
 consiste en: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly y Leu; Xaa35 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en:
 30 Tyr, Trp y Phe; Xaa39 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Gly, Ala, Ser y Asp; Xaa40 es
 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Gly y Ala; Xaa43 es un aminoácido seleccionado del grupo
 que consiste en: Asn y Gly; Xaa45 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Phe y Tyr y en la que
 el polipéptido inhibe la calicreína.

35 En una instancia particular, la isquemia es pérdida de sangre perioperativa debido a un procedimiento quirúrgico
 realizado en el paciente. El procedimiento quirúrgico puede ser una cirugía cardiorácica, tal como, por ejemplo,
 derivación cardiopulmonar o injerto de derivación de arterias coronarias.

En una instancia particular, las posiciones de los aminoácidos individuales de la SEC ID N° 1 puede ser una o más
 de las siguientes: Xaa10 es Asp, Xaa11 es Asp, Xaa13 es Pro, Xaa15 es Arg, Xaa16 es Ala, Xaa17 es Ala, Xaa18
 es His, Xaa19 es Pro, Xaa21 es Trp, Xaa31 es Glu, Xaa32 es Glu, Xaa34 es Ile, Xaa35 es Tyr, Xaa39 es Glu.

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

que consiste en: Asn y Gly; Xaa45 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Phe y Tyr y en la que el polipéptido inhibe la calicreína. En una instancia particular, el procedimiento quirúrgico puede ser una cirugía cardiorrástica, tal como, por ejemplo, derivación cardiopulmonar o injerto de derivación de arterias coronarias. En una instancia particular, las posiciones de los aminoácidos individuales de la SEC ID N° 1 pueden ser una o más de lo siguiente: Xaa10 es Asp, Xaa11 es Asp, Xaa13 es Pro, Xaa15 es Arg, Xaa16 es Ala, Xaa17 es Ala, Xaa18 es His, Xaa19 es Pro, Xaa21 es Trp, Xaa31 es Glu, Xaa32 es Glu, Xaa34 es Ile, Xaa35 es Tyr, Xaa39 es Glu.

En una realización, la invención se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 de la SEC ID N° 2), en la que el polipéptido inhibe la calicreína para uso en tratamiento o prevención de la respuesta inflamatoria sistémica en un paciente, pérdida de sangre perioperativa e isquemia.

En otra instancia en la descripción que comprende la invención, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 3-60 de la SEC ID N° 2), en la que el polipéptido inhibe la calicreína. En una instancia particular, la isquemia puede ser pérdida de sangre perioperativa debido un procedimiento quirúrgico realizado en el paciente. En una realización, el procedimiento quirúrgico es una cirugía cardiorrástica, tal como, por ejemplo, derivación cardiopulmonar o injerto de derivación de arterias coronarias.

En otra instancia más, la descripción se refiere a un método para prevenir o reducir el comienzo de respuesta inflamatoria sistémica asociada a un procedimiento quirúrgico en un paciente que comprende administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido que consta de la secuencia de aminoácidos: Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 5-60 de la SEC ID N° 2), en la que el polipéptido inhibe la calicreína. En una instancia, el procedimiento quirúrgico es una cirugía cardiorrástica, tal como, por ejemplo, derivación cardiopulmonar o injerto de derivación de arterias coronarias.

En una instancia, la descripción se refiere a un método para prevenir o reducir la isquemia en un paciente que comprende administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido que consta de la secuencia de aminoácidos: Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (aminoácidos 5-60 de la SEC ID N° 2), en la que el polipéptido inhibe la calicreína. En una instancia particular, la isquemia puede ser pérdida de sangre perioperativa debido a un procedimiento quirúrgico realizado sobre el paciente. En una instancia, el procedimiento quirúrgico es una cirugía cardiorrástica, tal como, por ejemplo, derivación cardiopulmonar o injerto de derivación de arterias coronarias.

Breve descripción de los dibujos.

La FIG. 1 es un diagrama simplificado de rutas múltiples principales y casos relacionados implicados en el sistema de activación por contacto y la respuesta inflamatoria sistémica (SIR) que puede surgir en un paciente sometido a traumatismo de tejidos blandos y óseos tales como el asociado a un procedimiento de injerto de derivación de arterias coronarias (CABG), especialmente cuando el procedimiento de CABG implica la circulación de sangre extracorpórea, tal como derivación cardiopulmonar (Aparato de Derivación). Las flechas indican la activación de un componente o caso para otro componente o caso en la cascada. Las flechas en ambas direcciones indican efectos de activación de componentes o casos en ambas direcciones. Las flechas rotas indican participación probable de un componente o caso en la activación de otro componente o caso. Las abreviaturas son como sigue: "tPA" = activador tisular del plasminógeno; "C5a" = un componente proteínico del sistema de complemento; "fXIIa" = proteína activadora de precalicreína para formar calicreína activa; "Extrínseco" = sistema de coagulación extrínseco; "Intrínseco" = sistema de coagulación intrínseco.

La FIG. 2 muestra una porción de un ADN y correspondiente aminoácido deducido para un polipéptido de IC de la invención en plásmido pPIC-K503. El ADN insertado codifica el péptido de señal prepro mata de *Saccharomyces cerevisiae* (subrayado) fusionado en el marco al término amino del polipéptido IC PEP-1 que tiene la secuencia de aminoácidos encerrada por el área limitada. La secuencia de aminoácidos del polipéptido IC PEP-1 mostrada en la región limitada es la SEC ID N° 2 y la correspondiente secuencia codificadora de nucleótidos del polipéptido IC es la SEC ID N° 3. Las flechas discontinuas indican la localización y dirección de las dos secuencias cebadoras de PCR en las regiones AOX que se usaron para producir plantillas de secuenciación. La secuencia de ADN para la secuencia de nucleótidos completa de la figura comprende la secuencia codificadora estructural para la proteína de fusión y se designa SEC ID N° 27. La doble porción subrayada de la secuencia indica una secuencia de sonda de diagnóstico. *Bst*FI y *Eco*RI indican localizaciones de sus respectivos sitios de endonucleasa de restricción hexaméricos, palindrómicos. Los arteriscos indican codones de parada de traducción.

Las FIGS. 3A y 3B muestran una alineación de secuencias de aminoácidos de las realizaciones preferidas de la invención, la secuencia LACI natural de la que proceden estas variantes (SEC ID N° 32) y otros dominios de Kunitz

conocidos (SEC ID N° 29-31 y 33-53). Los restos cisteína están marcados.

Descripción detallada de la invención.

La invención se basa en el descubrimiento de un grupo de polipéptidos inhibidores de la calicreína (IC) que inhiben la calicreína del plasma con una especificidad que permite su uso en métodos mejorados de prevención o reducción de isquemia tales como, por ejemplo, pérdida de sangre perioperatoria y/o una respuesta inflamatoria sistémica (SIR) inducida por calicreína, especialmente, por ejemplo, en pacientes que experimentan procedimientos quirúrgicos y en particular procedimientos quirúrgicos que implican cirugía cardiotorácica, por ejemplo, derivación cardiopulmonar (CPB), tal como un procedimiento de injerto de derivación de arterias coronarias (CABG). Los IC se pueden usar de manera específica para, por ejemplo, cirugía cardíaca pediátrica, trasplante de pulmón, artroplastia total de cadera y trasplante hepático ortotópico y para reducir o prevenir apoplejía perioperatoria durante CABG, oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO, por sus siglas en inglés) y accidentes cerebrovasculares (CVA, por sus siglas en inglés) durante estos procedimientos.

La cirugía cardiotorácica es cirugía del área torácica, lo más comúnmente el corazón y los pulmones. Las enfermedades típicas tratadas por cirugía cardiotorácica incluyen arteriopatía coronaria, tumores y tumores malignos del pulmón, esófago y pared torácica, vaso del corazón y anomalías en las válvulas y defectos de nacimiento que implican el pecho o el corazón. En el caso de que se utilice cirugía cardiotorácica para el tratamiento, se incurre en el riesgo de pérdida sanguínea (por ejemplo, isquemia inducida por cirugía) y el comienzo de una respuesta inflamatoria sistémica (SIR). La SIR inducida por cirugía puede dar como resultado disfunción orgánica severa (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; SIRS).

Polipéptidos útiles en la invención.

Los polipéptidos IC útiles en la invención comprenden polipéptidos con dominio de Kunitz. En una instancia de la descripción que comprende la invención, estos dominios de Kunitz son formas variantes de la estructura de bucle que comprende dominio 1 de Kunitz de proteína inhibidora de la coagulación asociada a lipoproteína humana (LACI). La LACI contiene tres estructuras de bucle peptídicas, bien definidas, internas, que son dominios de Kunitz de paradigma (Girard, T. et al., 1.989. Nature, 338: 518-520). Los tres dominios de Kunitz de LACI confieren la capacidad para unir e inhibir la calicreína, aunque no con excepcional afinidad. Se han identificado sistemáticamente variantes del dominio 1 de Kunitz de LACI descritas en la presente memoria, se han aislado y unido a calicreína con afinidad y especificidad mejoradas (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.795.865 y 6.057.287, incorporadas en la presente memoria por referencia). Un ejemplo de un polipéptido preferido útil en la invención presenta la secuencia de aminoácidos definida por los aminoácidos 3-60 de la SEC ID N° 2.

Cada polipéptido útil en la invención se une a la calicreína y los polipéptidos preferidos son también inhibidores de la calicreína (IC) cuando se determina usando ensayos de unión e inhibición de la calicreína conocidos en la técnica. La afinidad y la especificidad mejoradas para la calicreína de los polipéptidos con dominio de Kunitz de variante descritos en la presente memoria proporciona la base para su uso en cirugía cardiotorácica, por ejemplo, CPB y especialmente procedimientos de cirugía CABG, para evitar o reducir la pérdida de sangre perioperatoria y/o el comienzo de SIR en pacientes que experimentan dichos procedimientos. Los polipéptidos IC usados en la invención presentan o comprenden la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con dominio de Kunitz de variante aislado originalmente por detección sistemática de bibliotecas de presentación de fagos por la capacidad para unirse a calicreína.

Los polipéptidos IC útiles en los métodos y las composiciones de la descripción comprenden un polipéptido con dominio de Kunitz que comprende la secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys
 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26
 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39
 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys
 Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEC ID N°: 1)

"Xaa" se refiere a una posición en una cadena peptídica que puede ser cualquiera de una serie de diferentes aminoácidos. Por ejemplo, para los péptidos IC descritos en la presente memoria, Xaa10 puede ser Asp o Glu; Xaa11 puede ser Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala o Thr; Xaa13 puede ser Pro, Arg, His, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys o Gln; Xaa15 puede ser Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn o Gln; Xaa16 puede ser Ala, Gly, Ser, Asp o Asn; Xaa17 puede ser Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln o Thr; Xaa18 puede ser His, Leu, Gln o Ala; Xaa19 puede ser Pro, Gln, Leu, Asn o Ile; Xaa21 puede ser Trp, Phe, Tyr, His o Ile; Xaa31 puede ser Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile o Thr; Xaa32 puede ser Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly o Val; Xaa34 puede ser Ile, Thr, Ser, Val, Ala, Asn, Gly o Leu; Xaa35 puede ser Tyr, Trp o Phe; Xaa39 puede ser Glu, Gly, Ala, Ser o Asp. Los aminoácidos Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47,

Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 y Xaa54 pueden ser cualquier aminoácido. Adicionalmente, cada uno de los primeros cuatro y finalmente tres aminoácidos de la SEC ID N° 1 puede estar opcionalmente presente o ausente y puede ser cualquier aminoácido, si hay.

5 Los péptidos definidos según la SEC ID N° 1 forman una serie de polipéptidos que se unen a calicreína. Por ejemplo, un polipéptido IC útil en los métodos y las composiciones de la descripción presenta las siguientes posiciones variables: Xaa11 puede ser Asp, Gly, Ser o Val; Xaa13 puede ser Pro, Arg, His o Asn; Xaa15 puede ser Arg o Lys; Xaa16 puede ser Ala o Gly; Xaa17 puede ser Ala, Asn, Ser o Ile; Xaa18 puede ser His, Leu o Gln; Xaa19 puede ser Pro, Gln o Leu; Xaa21 puede ser Trp o Phe; Xaa31 es Glu; Xaa32 puede ser Glu o Gln; Xaa34 puede ser Ile, Thr o Ser; Xaa35 es Tyr y Xaa39 puede ser Glu, Gly o Ala.

10 Una instancia más específica de la descripción reivindicada se define por los siguientes aminoácidos en posiciones variables: Xaa10 es Asp; Xaa11 es Asp; Xaa13 puede ser Pro o Arg; Xaa15 es Arg; Xaa16 puede ser Ala o Gly; Xaa17 es Ala; Xaa18 es His; Xaa19 es Pro; Xaa21 es Trp; Xaa31 es Glu; Xaa32 es Glu; Xaa34 puede ser Ile o Ser; Xaa35 es Tyr y Xaa39 es Gly.

15 También se incluyen dentro del alcance de la descripción los péptidos que comprenden porciones de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los polipéptidos podían comprender dominios de unión para epítopos de calicreína específicos. Dichos fragmentos de los polipéptidos descritos en la presente memoria también se incluirían.

20 Los polipéptidos IC útiles en los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria comprenden un dominio de Kunitz. Un subconjunto de las secuencias incluidas por la SEC ID N° 1 se describe por lo siguiente (en el caso de que no se indique, "Xaa" se refiere al mismo conjunto de aminoácidos que están permitidos para la SEC ID N° 1):

**Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16
Xaa17 Xaa18 Xaa19 Arg Xaa21 Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Xaa31
Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEC ID N° 33).**

**Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(aminoácidos 3-60 de la SEC ID N° 2),**

**Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Asn His Leu
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 4),**

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Thr Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 5),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Gln Phe Thr Tyr Gly Gly Cys
Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 6),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Ser Leu Pro
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(SEC ID N° 7),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 8),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly Ala His Leu
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(SEC ID N° 9),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Lys Gly Ala His Leu
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu
Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
(SEC ID N° 10),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 11),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 12),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 13),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala Gln Pro
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 14),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Leu
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 15),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Gly Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Gln
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 16),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Gly Ala His Leu
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 17),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Arg Gly Ala Leu Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 18),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Asn Cys Arg Gly Asn Leu Pro
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 19),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Arg Cys Arg Gly Asn His Gln
Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 20),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Ala Ile Gln Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 21),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys
Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
Asp (SEC ID N° 22).

5 Las FIGS. 3A y 3B proporcionan una alineación de secuencias de aminoácidos de estas secuencias, la secuencia de LACI natural de la que proceden estas variantes (SEC ID N° 32) y otros dominios de Kunitz conocidos (SEC ID N° 29-31 y 33-53).

10 Los polipéptidos IC útiles en los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria se pueden preparar de manera sintética usando cualquier protocolo y equipo de síntesis de polipéptidos clásico. Por ejemplo, la síntesis por etapas de un polipéptido IC descrito en la presente memoria se puede llevar a cabo por la eliminación de un grupo protector (N) amino-terminal de un aminoácido inicial (es decir, carboxi-terminal) y acoplamiento al mismo del extremo carboxilo del siguiente aminoácido en la secuencia del polipéptido. Este aminoácido también está protegido

de manera conveniente. El grupo carboxilo del aminoácido nuevo puede ser activado para reaccionar con el N terminal del aminoácido ligado por formación en un grupo reactivo tal como formación en una carbodiimida, un anhídrido de ácido simétrico o un grupo "éster activo" tal como ésteres de hidroxibenzotriazol o pentafluorofenílicos. Los métodos de síntesis de péptidos de fase sólida preferidos incluyen el método BOC, que utiliza terc-butiloxycarbonilo como el grupo α -amino protector y el método FMOC, que utiliza 9-fluorenilmetloxocarbonilo para proteger el α -amino de los restos aminoácido. Ambos métodos son conocidos para los expertos en la materia (Stewart, J. y Young, J., *Solid-Phase Peptide Synthesis* (W. H. Freeman Co.; San Francisco 1.989); Merrifield, J., 1.963. *Am. Chem. Soc.*, 85: 2.149-2.154; Bodanszky, M. y Bodanszky, A., *The Practice of Peptide Synthesis* (Springer-Verlag, Nueva York 1.984). Si se desea, se pueden diseñar aminoácidos amino- y/o carboxi-terminales adicionales en la secuencia de aminoácidos y añadirse durante la síntesis de polipéptidos.

Alternativamente, los polipéptidos con dominio de Kunitz y los polipéptidos IC útiles en las composiciones y los métodos de la descripción que comprende la invención se pueden producir por métodos recombinantes usando cualquiera de una serie de células y vectores de expresión correspondientes, incluyendo pero no limitándose a, vectores de expresión bacterianos, vectores de expresión de levaduras, vectores de expresión de baculovirus, vectores de expresión de virus de mamíferos y similares. Los polipéptidos con dominio de Kunitz y los polipéptidos IC útiles en las composiciones y los métodos de la descripción que comprende la invención, también se pueden producir de manera transgénica usando moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia codificadora para un dominio de Kunitz o polipéptido IC descrito en la presente memoria, en la que la molécula de ácido nucleico se puede integrar en, y expresar de, el genoma de un animal huésped usando métodos transgénicos disponibles en la técnica. En algunos casos, podía ser necesario o ventajoso fusionar la secuencia codificadora para un polipéptido con dominio de Kunitz o polipéptido IC que comprenda el dominio de Kunitz a otra secuencia codificadora en un vector de expresión para formar un polipéptido de fusión que se exprese fácilmente en una célula huésped. Preferiblemente, la célula huésped que expresa dicho polipéptido de fusión también trata el polipéptido de fusión para proporcionar un dominio de Kunitz o polipéptido IC útil en la invención que contenga sólo la secuencia de aminoácidos deseada. Obviamente, si cualquier otro aminoácido o aminoácidos permanecen unidos al dominio de Kunitz expresado o polipéptido IC, dicho aminoácido o aminoácidos adicionales no deberían disminuir la unión de la calicreína y/o actividad inhibidora de calicreína del dominio de Kunitz o polipéptido IC a fin de impedir el uso del polipéptido en los métodos o las composiciones de la descripción que comprende la invención.

Un sistema de expresión recombinante preferido para producir polipéptidos IC útiles en los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria es un vector de expresión de levaduras, que permite que una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos para un polipéptido IC o polipéptido con dominio de Kunitz se una en el mismo marco de lectura con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia peptídica líder prepro mat α de *Saccharomyces cerevisiae*, que a su vez está bajo el control de un activador de levaduras operable. El plásmido de expresión de levaduras recombinante, resultante, se puede transformar después por métodos clásicos en las células de un huésped de levadura compatible, apropiado, cuyas células pueden expresar la proteína recombinante del vector de expresión de levaduras recombinante. Preferiblemente, una célula de levadura huésped transformada con dicho vector de expresión recombinante es también capaz de procesar la proteína de fusión para proporcionar un polipéptido IC activo útil en los métodos y las composiciones de la descripción que comprende la invención. Un huésped de levadura preferido para producir polipéptidos con dominios de Kunitz recombinantes y polipéptidos IC que comprenden dichos dominios de Kunitz es *Pichia pastoris*.

Como se indicó anteriormente, los polipéptidos IC que son útiles en los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria pueden comprender un polipéptido con dominio de Kunitz descrito en la presente memoria. Algunos polipéptidos IC pueden comprender una secuencia flanqueadora adicional, preferiblemente de uno a seis aminoácidos de longitud en el extremo amino y/o carboxi-terminal, siempre que dichos aminoácidos adicionales no disminuyan significativamente la afinidad de unión de la calicreína o la actividad de inhibición de la calicreína para que se impida el uso en los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria. Dichos aminoácidos adicionales se pueden añadir deliberadamente para expresar un polipéptido IC en una célula huésped recombinante particular o se pueden añadir para proporcionar una función adicional, por ejemplo, para proporcionar un péptido para unir el polipéptido IC a otra molécula o para proporcionar un resto de afinidad que facilite la purificación del polipéptido. Preferiblemente, el aminoácido o los aminoácidos adicionales no incluyen cisteína, que podía interferir con los enlaces disulfuro del dominio de Kunitz.

Un ejemplo de un polipéptido con dominio de Kunitz preferido, útil en los métodos y las composiciones de la invención presenta la secuencia de aminoácidos de 3-60 restos de la SEC ID N° 2. Cuando se expresa y se trata en un sistema de expresión de proteínas de fusión de levaduras (por ejemplo, basándose en el plásmido de expresión de integración pHIL-D2), dicho polipéptido con dominio de Kunitz retiene un dipéptido Glu-Ala amino-terminal adicional de la fusión con la secuencia peptídica líder prepro mat α de *S. cerevisiae*. Cuando se segrega de la célula huésped de levadura, la mayoría del péptido líder se trata desde la proteína de fusión para proporcionar un polipéptido IC funcional (referido en la presente memoria como "PEP-1") con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 (véase la región limitada en la FIG. 2).

Los polipéptidos IC particularmente preferidos, útiles en los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria presentan una afinidad de unión para calicreína que es del orden de 1.000 veces mayor que la de

aprotinina, que está homologada en la actualidad para uso en procedimientos de CABG para reducir la pérdida de sangre. Las afinidades de unión sorprendentemente altas de dichos polipéptidos IC descritos en la presente memoria indican que dichos polipéptidos IC presentan un alto grado de especificidad para calicreína a la exclusión de otros objetivos moleculares (véase la Tabla 1, a continuación). Así, el uso de dichos polipéptidos de acuerdo con la invención reduce mucho la especulación en cuanto a los posibles objetivos terapéuticos en un paciente. El menor grado de especificidad presentado por, por ejemplo, la aprotinina, conduce a posibles efectos secundarios pleiotrópicos y ambigüedad en cuanto a su mecanismo terapéutico.

Los polipéptidos definidos por, por ejemplo, la SEC ID N° 1 contienen posiciones invariantes, por ejemplo, las posiciones 5, 14, 30, 51 y 55 pueden ser Cys sólo. Otras posiciones tales como, por ejemplo, las posiciones 6, 7, 8, 9, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53 y 54 pueden ser cualquier aminoácido (incluyendo aminoácidos que no se encuentran en la naturaleza). En una instancia particularmente preferida, uno o más aminoácidos corresponden al de una secuencia natural (por ejemplo, la SEC ID N° 32, véase la FIG. 3). En una instancia preferida, al menos una posición variable es diferente de la de la secuencia original. En otra instancia preferida más, los aminoácidos pueden ser sustituidos cada uno de manera individual o de manera colectiva por una sustitución de aminoácidos conservadora o no conservadora. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras reemplazan a un aminoácido con otro aminoácido de estructura química similar y pueden no afectar a la función de la proteína. Las sustituciones de aminoácidos no conservadoras reemplazan un aminoácido con otro aminoácido de estructura química diferente. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservadas incluyen, por ejemplo, Asn->Asp, Arg->Lys y Ser->Thr. En una instancia preferida, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y/o 21 de estos aminoácidos se pueden seleccionar de manera independiente o de manera colectiva en cualquier combinación, para corresponder con las correspondientes posiciones de la SEC ID N° 2.

Otras posiciones, por ejemplo, las posiciones 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 y 45, pueden ser cualesquiera de un conjunto seleccionado de aminoácidos. Así, la SEC ID N° 1 define un conjunto de posibles secuencias. Cada miembro de este conjunto contiene, por ejemplo, una cisteína en las posiciones 5, 14, 30, 51 y 55 y uno cualquiera de un conjunto específico de aminoácidos en las posiciones 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 y 45. En una instancia preferida, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y/o 19 de estos aminoácidos se pueden seleccionar de manera independiente o de manera colectiva, en cualquier combinación, para corresponder con la correspondiente posición de la SEC ID N° 2. El péptido presenta preferiblemente al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad con la SEC ID N° 2.

30 Métodos y composiciones.

La presente invención también se refiere a prevenir o reducir la isquemia, pérdida de sangre perioperativa y respuesta inflamatoria. Se prefiere en la invención prevenir o reducir la pérdida de sangre perioperativa y/o una respuesta inflamatoria sistémica (SIR) en un paciente, especialmente asociada a cirugía cardiotorácica. Un tratamiento implica la administración de un polipéptido IC que comprende un dominio de Kunitz. Una instancia del método implica usar un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 que presenta una afinidad para calicreína que es aproximadamente 1.000 veces o más mayor que la de una serina proteasa de amplio intervalo, por ejemplo, aprotinina, que se aísla de pulmón bovino y está homologado en la actualidad para uso en procedimientos CABG (TRASYLOL[®], Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut).

Los pacientes sometidos a cualquiera de una serie de procedimientos quirúrgicos, especialmente los que implican circulación extracorpórea, por ejemplo, cirugía cardiotorácica, tal como, por ejemplo, CPB, y/o traumatismo óseo, tal como ruptura del esternón o artroplastia de cadera, tienen riesgo de pérdida de sangre perioperativa e inflamación. El contacto de la sangre de un paciente con las superficies de corte de hueso o de equipo de CPB es suficiente para activar una o varias respuestas de cascada no deseables, incluyendo un sistema de activación por contacto (CAS), que puede conducir a pérdida de sangre perioperativa extensa requiriendo transfusión sanguínea inmediata, así como una respuesta inflamatoria sistémica (SIR), que a su vez, puede dar como resultado daño permanente de tejidos y órganos. Aunque no se desea estar limitados a ningún mecanismo o teoría particular, parece que la pérdida de sangre que tiene lugar asociada a cirugía cardiotorácica, por ejemplo, CPB, como en un procedimiento de CABG, probablemente resulta de fuga capilar extensa, que puede dar como resultado pérdida significativa de sangre que debe ser reemplazada por transfusión sanguínea inmediata.

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

Las composiciones preferidas para uso médico comprenden un polipéptido IC descrito en la presente memoria. Dichas composiciones útiles pueden comprender además uno o más tampones, portadores y excipientes, farmacéuticamente aceptables, que pueden proporcionar una característica deseable a la composición incluyendo, pero no limitándose a, administración mejorada de la composición a un paciente, vida media de circulación mejorada del polipéptido IC de la composición, compatibilidad mejorada de la composición con la química de la sangre del

paciente, almacenamiento mejorado de la composición y/o eficacia mejorada de la composición en la administración a un paciente. Además de un polipéptido IC descrito en la presente memoria, las composiciones pueden comprender además otro u otros compuestos farmacéuticamente activos más que proporcionen un beneficio profiláctico o terapéutico adicional a un paciente de un procedimiento quirúrgico invasivo.

- 5 Las composiciones útiles en los métodos de la invención comprenden cualquiera de los polipéptidos con dominio de Kunitz o polipéptidos IC que comprenden dichos polipéptidos con dominio de Kunitz descritos en la presente memoria. Se prefieren en particular polipéptidos IC que comprenden un polipéptido con dominio de Kunitz que tiene una secuencia de 58 aminoácidos de los aminoácidos 3-60 de la SEC ID N° 2. Un ejemplo de dicho polipéptido IC particularmente preferido útil en los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria es el polipéptido IC PEP-1 que tiene la secuencia de 60 aminoácidos de la SEC ID N° 2. Se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 en la SEC ID N° 3 (véase, por ejemplo, los nucleótidos 309-488 en la FIG. 2). Se entiende que basándose en el código genético conocido, la invención también proporciona formas degeneradas de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 por sustitución simplemente de uno o más de los codones degenerados conocidos para cada aminoácido codificado por la secuencia de nucleótidos. Los nucleótidos 7-180 de la SEC ID N° 3, y las formas degeneradas de los mismos, codifican el polipéptido con dominio de Kunitz que no se encuentra en la naturaleza que tiene la secuencia de 58 aminoácidos de los aminoácidos 3-60 de la SEC ID N° 2.

20 Cualquiera de una variedad de moléculas de ácidos nucleicos puede comprender la secuencia de los nucleótidos 7-180 de la SEC ID N° 3, formas degeneradas y porciones de las mismas, incluyendo pero no limitándose a, genomas de fagos recombinantes, vectores víricos de mamífero recombinantes, vectores víricos de insecto recombinantes, minicromosomas de levaduras y diversos plásmidos. Dichos plásmidos incluyen los usados para clonar y/o expresar dichas secuencias de codificación de nucleótidos. Los vectores de expresión proporcionan un activador, que se puede unir de manera operable a una secuencia de nucleótidos particular y una célula huésped apropiada, que puede transcribir la secuencia codificadora de nucleótidos particular a un ARN mensajero funcional (ARNm) y traducir también el ARNm al correspondiente polipéptido. Se puede aislar después un polipéptido así producido de la célula huésped. Las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio de Kunitz o polipéptido IC descrito en la presente memoria se puede preparar por métodos de síntesis de ácidos nucleicos clásicos, metodologías de ADN recombinante, métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y cualquier combinación de los mismos.

- 30 Pérdida de sangre perioperativa y flujo sanguíneo cardíaco reducido.

Debido a los muchos avances en la medicina, se lleva a cabo una serie de procedimientos quirúrgicos altamente invasivos cada día que dan como resultado pérdida de sangre o ponen a los pacientes en un alto riesgo de pérdida de sangre. Dichos pacientes se deben controlar cuidadosamente para recuperar y mantener el suministro sanguíneo y la homeostasis normales y pueden requerir transfusiones sanguíneas. Los procedimientos quirúrgicos que implican pérdida de sangre incluyen los que implican métodos de circulación extracorpórea tales como cirugía cardiotorácica, por ejemplo, CPB. En tales métodos, se detiene el corazón de un paciente y la circulación, oxigenación y mantenimiento del volumen de sangre se llevan a cabo de manera artificial usando un circuito extracorpóreo y un oxigenador de membrana sintético. Estas técnicas se usan comúnmente durante la cirugía cardíaca. Adicionalmente, es evidente que la cirugía que implica traumatismo extenso al hueso, tal como la rotura del esternón necesaria en procedimientos de CABG o artroplastia de cadera, también está asociada a la activación del CAS, que puede dar como resultado una variedad de alteraciones en la sangre y la vasculatura.

45 La arteriopatía coronaria (CAD, por sus siglas en inglés) aterosclerótica produce un estrechamiento del lumen de una o varias de las arterias coronarias; esto limita el flujo de sangre al miocardio (es decir, el músculo cardíaco) y puede producir angina, insuficiencia cardíaca e infartos de miocardio. En la fase final de la aterosclerosis de arteria coronaria, la circulación coronaria puede estar ocluida casi completamente, produciendo angina o insuficiencia cardíaca mortal, con una mortalidad muy alta. Se pueden requerir procedimientos de CABG para unir el vaso sanguíneo ocluido y restaurar la sangre al corazón; éstos son potencialmente salvadores de la vida. Los procedimientos de CABG están entre los más invasivos de las cirugías en las que una o más venas o arterias sanas se implantan para proporcionar una "derivación" alrededor del área ocluida del vaso enfermo. Los procedimientos de CABG soportan con ellos un pequeño pero importante riesgo perioperativo, pero son muy exitosos proporcionando a los pacientes un alivio inmediato de la mortalidad y morbilidad de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. A pesar de estos resultados muy alentadores, los procedimientos de CABG repetidos son frecuentemente necesarios, como se indica por un aumento claro en el número de pacientes que experimentan eventualmente segundo e incluso tercer procedimientos; la mortalidad y morbilidad perioperativas observadas en procedimientos de CABG primarios aumentan en estos procedimientos de hacer de nuevo.

60 Ha habido mejoras en las técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas para CAD no complicadas. Sin embargo, casi todos los procedimientos de CABG realizados para enfermedad cardíaca valvular y/o congénita, trasplante de corazón y procedimientos aórticos principales, aún se llevan a cabo en pacientes soportados por CPB. En CPB, se insertan grandes cánulas en los vasos grandes de un paciente para permitir el bombeo mecánico y la oxigenación de la sangre usando un oxigenador de membrana. La sangre es devuelta al paciente sin fluir por los pulmones, que están hipoperfundidos durante este procedimiento. El corazón se detiene usando una disolución cardiopléctica, el

paciente es enfriado para ayudar a prevenir el daño cerebral y el volumen de circulación periférica es aumentado por un circuito extracorpóreo, es decir, el circuito CPB, que requiere “cebado” con sangre del donador y se usan mezclas de disolución salina para rellenar el circuito extracorpóreo. La CPB se ha usado extensamente en una variedad de procedimientos realizados durante casi medio siglo con resultados exitosos. La interacción entre las superficies artificiales, las células sanguíneas, proteínas de la sangre, endotelio vascular dañado y tejidos extravasculares, tales como el hueso, altera la hemostasis y activa con frecuencia el CAS, que, como se indicó anteriormente, puede dar como resultado una variedad de trastornos en la sangre y la vasculatura. Tal trastorno conduce a sangrado perioperativo en exceso, que requiere entonces la transfusión sanguínea inmediata. Una consecuencia de la circulación de la sangre completa por un circuito extracorpóreo en CPB también puede incluir la respuesta inflamatoria sistémica (SIR), que se inicia por activación por contacto de los sistemas de coagulación y de complemento. Por supuesto, gran parte de la morbilidad y mortalidad asociadas a procedimientos quirúrgicos de CPB mecánicamente exitosos aparentemente es el resultado de los efectos de activar la coagulación, fibrinólisis o sistemas de complemento. Dicha activación puede dañar el sistema pulmonar, conduciendo a síndrome de dificultad respiratoria en adultos (ARDS, por sus siglas en inglés), trastorno del riñón y circulación esplácnica e inducción de una coagulopatía general que conduce a pérdida de sangre y la necesidad de transfusiones. Además de los peligros de la pérdida de sangre perioperativa, las patologías adicionales asociadas a SIR incluyen deficiencias neurocognitivas, apoplejía, deficiencia renal, infarto agudo de miocardio y daño del tejido cardíaco.

Las transfusiones sanguíneas también presentan un riesgo significativo de infección y elevan el coste de CABG u otros procedimientos similares que requieran CPB. En ausencia de cualquier intervención farmacológica, se deben invertir típicamente tres a siete unidades de sangre en un paciente, incluso con excelentes técnicas quirúrgicas. De acuerdo con esto, hay un considerable incentivo para el desarrollo de compuestos farmacológicamente eficaces nuevos y mejorados para reducir o prevenir el sangrado perioperativo y SIR en pacientes sometidos a procedimientos de CPB y CABG.

Consideraciones de administración y dosificación para polipéptidos IC.

Los polipéptidos IC descritos en la presente memoria se pueden administrar a un paciente antes, durante y/o después de un procedimiento quirúrgico en una composición farmacéuticamente aceptable. El término composición “farmacéuticamente aceptable” se refiere a un portador o excipiente no tóxico que se puede administrar a un paciente, junto con un compuesto de esta invención y en la que el portador o excipiente no destruye la actividad biológica o farmacológica de la composición. Los polipéptidos IC descritos en la presente memoria se pueden administrar por vía local o por vía sistémica por cualquier medio adecuado para suministrar una cantidad inhibitoria de calicreína de los polipéptidos IC a un paciente incluyendo, pero no limitado a, administraciones sistémicas tales como, por ejemplo, intravenosa e inhalación. Se prefiere en particular la administración parenteral.

Para administración parenteral, los polipéptidos se pueden inyectar por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal o por vía subcutánea. Se prefiere la administración intravenosa. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Otros portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, disolución salina y disolución tamponada (incluyendo tampones como fosfato o acetato), alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina, etc. En el caso de que sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para atenuar el dolor en el sitio de la inyección, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales, lubricantes, etc. siempre que no reaccionen de manera perjudicial con los compuestos activos. De manera similar, la composición puede comprender excipientes convencionales, por ejemplo, sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para aplicación parenteral, enteral o intranasal que no reaccionen de manera perjudicial con los compuestos activos. En general, los ingredientes se suministrarán por separado o mezclados juntos en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o producto de concentración exento de agua en un contenedor sellado herméticamente tal como una ampolla o bolsita indicando la cantidad de agente activo en unidades de actividad. En el caso de que se tenga que administrar la composición por infusión intravenosa, se puede dispensar con una botella de infusión que contenga “agua para inyección” de grado farmacéutico, estéril o disolución salina. En el caso de que la composición se tenga que administrar por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o disolución salina para que los ingredientes se puedan mezclar previamente a administración.

Preferiblemente, los métodos descritos en la presente memoria comprenden administrar un polipéptido IC a un paciente como una infusión intravenosa de acuerdo con cualquier procedimiento homologado. Así, un polipéptido IC descrito en la presente memoria se puede administrar a un paciente sometido a un procedimiento de CABG en los momentos similares a los usados en la actualidad en protocolos homologados para administrar aprotinina y en una cantidad necesaria para proporcionar a un paciente un número requerido o concentración requerida de unidades inhibitorias de calicreína (UIC). De acuerdo con la invención, un polipéptido IC descrito en la presente memoria también se puede administrar a un paciente en el periodo postoperativo inmediato, cuando tienen lugar anomalías del sangrado como consecuencia de efectos aguas abajo de SIR. Por ejemplo, en un procedimiento que implica CPB, un polipéptido IC descrito en la presente memoria puede ser administrado a un paciente como una dosis de carga inicial, por ejemplo, una cantidad eficaz durante un tiempo conveniente, tal como 10 minutos,

previamente a inducción de la anestesia. Después, en la inducción de la anestesia, se puede inyectar una segunda dosis de polipéptido IC en el fluido de cebado de CPB ("volumen de cebado de la bomba"). Se puede poner después al paciente una dosis de infusión intravenosa continua y controlada durante la duración del procedimiento quirúrgico y después del procedimiento si se indica.

- 5 En la actualidad hay dos regímenes homologados en los Estados Unidos para administrar aprotinina a un paciente que experimenta un procedimiento de CABG (véase, etiqueta e inserto del producto para TRASYLOL[®], Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut). Uno de dichos regímenes homologados usa una dosis de carga intravenosa de 2 millones de UIC, 2 millones de UIC en el volumen de cebado de la bomba y 500.000 UIC por hora de cirugía. Otro régimen homologado usa una dosis de carga intravenosa de 1 millón de UIC, 1 millón de UIC en el volumen de cebado de la bomba y 250.000 UIC por hora de cirugía. Como estos regímenes se basan en UIC, los regímenes se adaptan fácilmente a cualquier polipéptido IC descrito en la presente memoria una vez que ha sido determinada la actividad específica y UIC de un polipéptido IC particular por ensayos clásicos. Debido a la afinidad de unión y la actividad inhibidora mejoradas en los polipéptidos IC representativos descritos en la presente memoria relativos a aprotinina, se espera que dichas composiciones y métodos de la invención requieran probablemente menos miligramos (mg) por paciente para proporcionar a un paciente el número requerido o la concentración requerida de UIC.

Se pueden ilustrar varias consideraciones considerando la dosificación con un polipéptido IC en métodos descritos en la presente memoria como ejemplo con el polipéptido IC PEP-1 representativo de la invención con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 (peso molecular de 7.054 Daltons).

- 20 La Tabla 1, a continuación, proporciona una comparación de la afinidad ($K_{i,app}$) del polipéptido IC PEP-1 para calicreína y otras once proteasas de plasma conocidas.

Tabla 1.

Sustrato de proteasa	$K_{i,pp}$ PEP-1 (pM)	$K_{i,app}$ Aprotinina (pM)
calicreína de plasma humano	44	$3,0 \times 10^4$
calicreína de orina humana	$>1 \times 10^8$	$4,0 \times 10^3$
calicreína pancreática porcina	$2,7 \times 10^7$	550
C1r humana, activada	$>2,0 \times 10^8$	$>1,0 \times 10^7$
C1s humana, activada	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
factor de plasma humano XIa	$1,0 \times 10^4$	ND
factor de plasma humano XIIa	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
plasmina humana	$1,4 \times 10^5$	894
tripsina pancreática humana	$>2 \times 10^7$	ND
quimotripsina pancreática humana	$>2,0 \times 10^7$	$7,3 \times 10^5$
elastasa de neutrófilos humana	$>2,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6$
trombina de plasma humano	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
ND = no determinado		

- 25 Claramente, el polipéptido IC PEP-1 es altamente específico para calicreína de plasma humano. Además, la afinidad ($K_{i,app}$) de PEP-1 para calicreína es 1.000 veces mayor que la afinidad de la aprotinina para calicreína: la $K_{i,app}$ de PEP-1 para calicreína es aproximadamente 44 pM (Tabla 1), mientras que la $K_{i,app}$ de aprotinina para calicreína es 30.000 pM. Así, una dosis de PEP-1 podía ser aproximadamente 1.000 veces menor que la usada para aprotinina

sobre una base por mol. Sin embargo, la consideración de otros diversos factores puede proporcionar una estimación más precisa de la dosis de PEP-1 requerida en la práctica. Dichos factores incluyen la cantidad de calicreína activada durante CPB en un paciente particular, la concentración de calicreína requerida para provocar una SIR y la biodisponibilidad y la distribución farmacológica de PEP-1 en un paciente. Sin embargo, se espera aún el uso de un polipéptido IC en los métodos de acuerdo con la invención y proporcionado en dosis homologadas en la actualidad para el uso de aprotinina para proporcionar mejoras significativas por el uso actual de la aprotinina bovina, menor afinidad, menos específica.

Por ejemplo, la cantidad total de pre-calicreína de circulación en plasma es estimada en aproximadamente 500 nM (Silverberg, M. et al., "The Contact System and Its Disorders," en *Sangre: Principles and Practice of Hematology*, Handin, R. et al., eds., JB Lippincott Co., Philadelphia, 1.995). Si toda la precalicreína fuera activada, entonces se requeriría al menos 500 nM de PEP-1 para una inhibición estequiométrica de la calicreína. Un individuo con 5 litros de plasma requeriría por lo tanto aproximadamente 18 mg de PEP-1 para conseguir una concentración en plasma de 500 nM.

Otro factor que se tiene que considerar es la concentración umbral de calicreína requerida para inducir una SIR en un paciente. Si la concentración de calicreína activa se debe mantener por debajo de, por ejemplo, 1 nM, entonces debido a su alta afinidad por calicreína, PEP-1 ofrece una ventaja significativa sobre la aprotinina en la cantidad de proteína que se requeriría para inhibir SIR. En particular, una concentración de PEP-1 de 1 nM inhibiría el 99,6% de la calicreína presente a 1 nM (es decir, sólo 0,4 pM de calicreína libre que permanece en la sangre), mientras una concentración de aprotinina de 1 nM inhibiría solamente el 24,5% de la calicreína presente a 1 nM. Para que la aprotinina inhiba el 99% de la calicreína a 1 nM, se requiere una concentración de aprotinina en el plasma de al menos 3 µM (es decir, concentración 3.000 veces mayor que para PEP-1).

Para un paciente que experimenta CPB, se puede estimar una dosis clínica inicial de PEP-1 a partir de un régimen de dosificación recomendado de aprotinina (1×10^6 UIC) mencionado anteriormente. Se indica en un inserto de envase que la aprotinina tiene una actividad inhibitoria específica de 7.143 UIC/mg determinada usando un ensayo de presión sanguínea de perro. Por lo tanto, 1×10^6 UIC de aprotinina es equivalente a 140 mg de aprotinina (es decir, 1×10^6 UIC/7.143 UIC/mg = 140 mg de aprotinina). En un paciente con un volumen de plasma sanguíneo de 5 litros, 140 mg corresponde a aproximadamente aprotinina 4,3 µM (el peso molecular de aprotinina es 6.512 Daltons). La actividad específica de la aprotinina en el ensayo inhibitorio clásico usado para PEP-1 es 0,4 UIC/mg de polipéptido. Una dosis de 140 mg correspondería una dosis de carga para aprotinina de 56 UIC ($140 \text{ mg} \times 0,4 \text{ UIC/mg} = 56 \text{ UIC}$). Por el contrario, puesto que la actividad específica del polipéptido IC PEP-1 es 10 UIC/mg en el ensayo de inhibición clásico, se requeriría una dosis de sólo 5,6 mg de PEP-1 para proporcionar el número de UIC equivalentes a 140 mg de aprotinina. En un paciente con un volumen de plasma de 5 litros, esto corresponde a PEP-1 aproximadamente 160 nM (el peso molecular de PEP-1 es 7.054 Daltons), aunque se puede requerir una dosis superior del polipéptido IC PEP-1 si se activa toda la calicreína del plasma (500 nM) y/o si este polipéptido IC está deficientemente distribuido en un paciente.

Además, los polipéptidos IC no se pueden encontrar en la naturaleza y se pueden producir de manera sintética o de manera recombinante, como se indicó anteriormente, evitándose de ese modo la contaminación potencial de enfermedades transmisibles que pueden surgir durante el aislamiento de una proteína de una fuente animal natural, tal como en el caso de la aprotinina, que se aísla de pulmón bovino. Cada vez más importante para la aceptación administrativa y pública de un tratamiento o composición farmacéutica que comprende un polipéptido es evitar la posible contaminación con, y la transmisión a, pacientes humanos de diversos agentes patológicos. Es de particular interés para la seguridad de las proteínas aisladas de un tejido bovino la eliminación del posible riesgo de exposición a enfermedades mediadas por virus, enfermedades mediadas por bacterias y, especialmente, encefalopatías espongiiformes bovinas transmisibles.

Como variantes del dominio 1 de Kunitz de la proteína LACI humana, se esperan menos efectos secundarios de administrar los polipéptidos IC a pacientes que para aprotinina, que es una proteína bovina que está documentado que produce respuestas anafilácticas y anafilactoides en pacientes, especialmente en administraciones repetidas, tales como procedimientos de CABG de segunda vez. Adicionalmente, la unión altamente específica de los polipéptidos IC descrita en la presente memoria para calicreína limitará o eliminará con eficacia las tendencias trombóticas observadas con la aprotinina y reducirá los problemas observados con la permeabilidad del injerto siguiendo procedimientos de CABG.

La invención se describirá además con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. Las explicaciones de todas las patentes, solicitudes de patente y todas las demás publicaciones y sitios web citados en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad.

Ejemplificación

Ejemplo 1: Un polipéptido IC representativo.

Un polipéptido IC (PEP-1) que no se encuentra en la naturaleza, útil en las composiciones y los métodos de la invención se identificó como un polipéptido de unión de calicreína mostrado en un fago recombinante de una

biblioteca de presentación de fagos. PEP-1 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEC ID N° 2). El peso molecular de PEP-1 es 7.054 Daltons.

- 5 La secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 3) del ADN de fago recombinante que codifica la secuencia de aminoácidos de PEP-1 (aminoácidos 3-60 de la SEC ID N° 2) se aisló y se secuenció por métodos clásicos determinados a partir del ADN de fago recombinante. Se produjo PEP-1 en cantidades útiles para caracterización adicional como una proteína recombinante en células huésped de fenotipo *His4* de cepa de levadura *Pichia pastoris*.

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

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

- 15 1. El sitio *Bst*BI en la región 3' AOX1 de pHIL-D2, situada aguas abajo del gen *His4*, se retiró por digestión de restricción parcial, relleno y ligadura, alterando la secuencia de TTCGAA (SEC ID N° 23) a TTCGCGAA (SEC ID N° 24). Esta modificación se realizó para facilitar y dirigir la clonación de la casete de expresión en el plásmido.
- 20 2. El sitio *Aat*II que soporta el gen *bla* situado aguas abajo de *His4* se retiró por digestión de restricción, llenado y ligadura modificando la secuencia de GACGTC (SEC ID N° 25) a GACGTACGTC (SEC ID N° 26). Esta modificación se realizó para facilitar la clonación de casetes de expresión con sitios *Aat*II en el plásmido. El ADN que codifica PEP-1 fue sintetizado basándose en la secuencia de nucleótidos del fago que muestra la unión de caliceína original y constaba de 450 pares de bases (pb). La secuencia de ADN final del inserto en el plásmido pHIL-D2 es flanqueada por una secuencia 5' AOX1 y una secuencia 3' AOX1 (porciones de las cuales se muestran en la FIG. 2) y codifica una proteína de fusión que comprende el péptido de señal prepro mata de *S. cerevisiae* fusionado a la secuencia codificadora estructural para el polipéptido IC PEP-1. Se añadió el péptido de señal para facilitar la secreción de PEP-1 de las células huésped de levadura. Se sintetizaron los oligonucleótidos para formar el inserto y se obtuvieron comercialmente (Genesis Labs, The Woodlands, TX) y el inserto fue generado por reacción de cadena de la polimerasa (PCR). El ADN sintético ligado que codifica la proteína de fusión prepro/PEP-1 mata se incorporó después por ligadura en el plásmido pHIL-D2 modificado entre los sitios *Bst*BI y *Eco*RI.

Los productos de ligadura se usaron para transformar la cepa de *Escherichia coli* XL1 Blue. Se usó un ensayo PCR para detectar sistemáticamente transformantes de *E. coli* para la construcción de plásmido deseada. Se multiplicó ADN de extractos celulares por PCR usando cebadores que contenían las secuencias 5' AOX1 y 3' AOX1 (véase anteriormente y FIG. 2). Se secuenciaron los productos PCR del número correcto de pares de bases. Además, se secuenciaron aproximadamente 20-50 pb en cada lado de los sitios de clonación y se obtuvo la secuencia prevista. La secuencia de ADN final del inserto en el plásmido pHIL-D2 (para proporcionar plásmido pPIC-K503) se muestra en la FIG. 2 junto con porciones de las secuencias 5' y 3' AOX1 de franqueo y la correspondiente secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión que comprende el péptido de señal prepro mata de *S. cerevisiae* fusionado a la secuencia codificadora estructural para el polipéptido IC PEP-1. Se selecciona un transformante con la construcción de plásmido de expresión deseada, plásmido pPIC-K503, para preparar estirpes celulares de levadura para producción de rutina de PEP-1.

Ejemplo 3: Fabricación de PEP-1 de estirpe celular de levadura recombinante.

Se transformaron esferoplastos de *P. pastoris* GS 115 con el fenotipo *His4* con el plásmido de expresión pPIC-K503 (anterior) siguiendo linearización del plásmido en el sitio *Sac*I y recombinación homóloga del ADN de plásmido en el sitio del huésped 5' AOX1. El fenotipo de la cepa de producción es *His4*⁺. Se insertó el plásmido completo en la secuencia genómica 5' AOX1 de la levadura.

En los aislados de la transformación se detectó sistemáticamente el crecimiento en ausencia de histidina exógena con metanol como la única fuente de carbono. Más del 95% de los transformantes retuvieron la capacidad original de crecer con metanol como la única fuente de carbono, demostrando de ese modo que el plásmido había sido insertado en el genoma huésped por recombinación homóloga más bien que trasplante. Estos transformantes no requirieron histidina exógena para crecimiento, demostrándose de ese modo que el plásmido se había integrado en el genoma huésped. Se clonaron las colonias seleccionadas. Se realizaron estudios de expresión de pequeño cultivo para identificar clones que segregan los niveles más altos de PEP-1 activo en el medio de cultivo. Los niveles de secreción de PEP-1 en disoluciones de sobrenadante de cultivo clarificadas se cuantificaron para niveles de PEP-1 mediante electroforesis de gel de dodecilsulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE) y se evaluó la inhibición de caliceína. Se seleccionó un clon de levadura para producción de PEP-1 basándose en su alto nivel de expresión de PEP-1 entre los cultivos muestreados.

Se prepararon comercialmente bancos de células patrón y de trabajo de *P. pastoris* que producen PEP-1 (MDS Pharma Services, Bothell, Washington). Una producción clásica de PEP-1 en levadura comprendía tres etapas como sigue: (1) preparación del cultivo de siembra, (2) fermentación y (3) recuperación del cultivo.

5 La etapa de cultivo de siembra constaba de la inoculación de seis matraces (cada uno de 300 ml) conteniendo caldo de inóculo estéril (base de nitrógeno de la levadura, fosfato de potasio y glicerol, pH = 5) con los contenidos de un único vial de un banco de células de trabajo de *P. pastoris* que producen PEP-1. Se inocularon los matraces en un agitador orbital (31 rad/s (300 rpm)) durante aproximadamente 13 horas a 30°C ± 2°C.

10 Se realizaron fermentaciones en un fermentador Braun de 100 litros cerrado, cargado con caldo estéril. Cada fermentación se inició con la transferencia de los contenidos de los seis matraces de cultivo de siembra al fermentador. Después de aproximadamente 24 horas, el glicerol en el fermentador llegó a agotarse y se añadió glicerol adicional durante aproximadamente 8 horas adicionales.

15 Una fase de alimentación mixta, que duró aproximadamente 83 horas, se inició después por la adición de una alimentación de glicerol y metanol. Al final de este tiempo, se terminó la fermentación y se diluyeron los contenidos de fermentador con agua purificada. La purificación y el tratamiento de PEP-1 constaba de cinco etapas como sigue: (1) cromatografía de lecho expandido, (2) cromatografía de intercambio catiónico, (3) cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés), (4) ultrafiltración y diafiltración y (5) filtración final y envasado.

20 La etapa de purificación inicial consistía en cromatografía de lecho expandido. Se aplicó el cultivo del fermentador diluido a la columna equilibrada empaquetada con resina Streamline SP (columna de cromatografía Amersham Pharmacia Streamline 200, Amersham Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey). Después se lavó la columna (ácido acético 50 mM, pH = 3,0 - 3,5) en un modo flujo ascendente para descargar las células de la levadura del lecho expandido. Se elevó el adaptador superior por encima del lavado de mejora del lecho expandido. Se detuvo el flujo y se permitió que el lecho se sedimentara. Se movió el adaptador hacia abajo para que estuviera ligeramente por encima del lecho sedimentado. La dirección del flujo se invirtió. Se recogió el efluente. Se continuó el lavado en un modo descendente usando acetato de sodio 50 mM, pH 4,0. Se recogió el efluente. Se eluyó PEP-1 de la columna usando acetato de sodio 50 mM, pH 6,0. Se recogió el eluato en un contenedor de 50 litros. El eluato se filtró después a través de un filtro de 0,22 µ en un contenedor limpio colocado en el sitio de purificación. Se recogieron muestras adicionales para la determinación de la concentración de PEP-1. Después se realizó una etapa de cromatografía de intercambio catiónico usando el eluato filtrado de la columna de lecho expandido. Se eluyó PEP-1 de la columna usando citrato de trisodio 15 mM, pH 6,2.

30 Se retiraron proteínas adicionales de la preparación de PEP-1 por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Previamente a HIC, el eluato de la columna de intercambio catiónico se diluyó con sulfato de amonio. Se aplicó el eluato a la columna y se eluyó el PEP-1 usando sulfato de amonio (0,572 M) en fosfato de potasio (100 mM), pH 7,0. Se recogió el eluato en fracciones basándose en valores A280. Se recogieron todas las fracciones en botes de PETG pesados previamente, estériles.

35 Se mezclaron las fracciones seleccionadas en un contenedor limpio. Se concentró la mezcla por ultrafiltración. La preparación de PEP-1 concentrada se diafiltró inmediatamente contra diez volúmenes de PBS, pH 7,0.

40 Se realizó una etapa de filtración final previamente a envasado para minimizar la biocarga en el PEP-1 volumétrico. Se filtró la disolución volumétrica a través de un filtro de 0,22 µ y se recogió en un bote de PETG pesado previamente, estéril. Se retiró una muestra para ensayo de liberación del lote. El resto del volumen se dispensó de manera aséptica en botes de PETG estériles y se almacenó a -20°C.

Ejemplo 4: Ensayo de inhibición de calicreína.

45 Se usó un ensayo cinético para medir la actividad inhibidora de polipéptidos IC, tales como PEP-1. El ensayo cinético mide la fluorescencia siguiendo a la escisión mediada por calicreína de un sustrato, prolilfenilalanilarginilaminometilcumarina. Se incubó una cantidad conocida de calicreína con un patrón de referencia de polipéptido IC diluido en serie o muestras de ensayo de polipéptido IC diluido en serie, en un tampón de reacción adecuado en una placa de microtítulo. Cada muestra se realizó por triplicado. Se añadió la disolución de sustrato y se leyó la placa inmediatamente usando una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Al menos se requirieron dos de cada una de las curvas patrón de referencia y de muestra para tener un valor de R-cuadrado de 0,95 que se considera válido.

50

Listado de secuencias

<110> Dyax Corporation

<120> PREVENCIÓN Y REDUCCIÓN DE PÉRDIDA DE SANGRE

<130> P33517EP-D3-PCT

<140> EP10180486.2

<141> 2003-06-06

<150> US 60/387,239

<151> 2002-06-07

<150> US 60/407,003

<151> 2002-08-28

<160> 54

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido que Inhibe Calicreína

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1) .. (4)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6) .. (9)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (20)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (24) .. (29)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (41) .. (42)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (44)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (46) .. (50)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (52) .. (54)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (56) .. (58)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)

<223> Can be Glu

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)

<223> Can be Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala o Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)

<223> Can be His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys
o Gln

<220>

<221> VARIANTE

<222> (15)

<223> Can be Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn o Gln

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)

<223> Can be Gly, Ser, Asp o Asn

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)

<223> Can be Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln o Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (18)

<223> Can be Leu, Gln o Ala

<220>

<221> VARIANTE

<222> (19)

<223> Can be Gln, Leu, Asn o Ile

<220>
<221> VARIANTE
<222> (21)
<223> Can be Phe, Tyr, His o Ile

<220>
<221> VARIANTE
<222> (22)
<223> Can be Phe

<220>
<221> VARIANTE
<222> (23)
<223> Can be Phe

<220>
<221> VARIANTE
<222> (31)
<223> Can be Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile
o Thr

<220>
<221> VARIANTE
<222> (32)
<223> Can be Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala,
Gly o Val

<220>
<221> VARIANTE
<222> (34)
<223> Can be Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly o Leu

<220>
<221> VARIANTE
<222> (35)
<223> Can be Trp o Phe

<220>
<221> VARIANTE
<222> (39)
<223> Can be Gly, Ala, Ser o Asp

<220>
<221> VARIANTE
<222> (40)
<223> Can be Ala

<220>
<221> VARIANTE
<222> (43)
<223> Can be Gly

<220>
<221> VARIANTE
<222> (45)
<223> Can be Tyr

ES 2 559 927 T3

<400> 1

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

<210> 2

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de Unión Aislado

<400> 2

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

<210> 3

<211> 179

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Codificadora de PEP-1

<400> 3

gaggctatgc actctttctg tgctttcaag gctgacgacg gtcgtgcaga gctgctcacc 60
caagatgggt cttcaacatc ttcacgcgctc aatgcgagga gttcatctac ggtggttgtg 120
agggtaacca aacagattc gagtctctag aggagtgtaa gaagatgtgt actagagac 179

<210> 4

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de Unión Aislado

<400> 4

Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Asp	Gly	Pro	Cys	Lys	Ala
1				5					10					15	

ES 2 559 927 T3

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

<210> 20
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido de Unión Aislado

<400> 20

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

<210> 21
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido de Unión Aislado

<400> 21

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

<210> 22
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido de Unión Aislado

<400> 22

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Arg Gly
 1 5 10 15

ES 2 559 927 T3

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

<210> 23

<211> 6

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de Clonación Modificado

<400> 23

ttcgaa

6

<210> 24

<211> 8

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de Clonación Modificado

<400> 24

ttcgcgaa

8

<210> 25

<211> 6

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de Clonación Modificado

<400> 25

gacgtc

6

<210> 26

<211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de Clonación Modificado

<400> 26

gacgtacgtc

10

<210> 27

<211> 548

ES 2 559 927 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de Nucleótidos de Proteína de Fusión

<400> 27

```

cgacttttaa cgacaacttg agaagatcaa aaaacaacta attattcgaa acgatgagat 60
tcccatctat cttcactgct gttttgttcg ctgcttcctc tgctttggct gctccagtta 120
acaccactac tgaagacgag actgctcaaa ttctgctga ggctgtcatc ggttactctg 180
acttggaagc tgacttcgac gtcgctgttt tgccattctc taactctact aacaacggtt 240
tgttgttcat caacactacc atcgcttcta tcgctgctaa ggaggaaggt gtttccctcg 300
agaagagaga ggctatgcac tctttctgtg ctttcaaggc tgacgacggc ccgtgcagag 360
ctgctcacc aagatggttc ttcaacatct tcacgcgtca atgcgaggag ttcactctacg 420
gtggttgtga gggtaaccaa aacagattcg agtctctaga ggagtgtgta aagatgtgta 480
ctagagacta gtaagaattc gccttagaca tgactgttcc tcagttcaag ttgggcactt 540
acgagaag                                     548
    
```

<210> 28

<211> 145

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de Fusión

<400> 28

```

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1          5          10
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20          25          30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35          40          45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50          55          60
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65          70          75          80
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala
85          90          95
Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile
100         105         110
Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn
115         120         125
Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
130         135         140
Asp
145
    
```

<210> 29

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia BPTI

ES 2 559 927 T3

<400> 29

```

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

```

<210> 30

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia ITI-D1

<400> 30

```

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

```

<210> 31

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia ITI-D2

<400> 31

```

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

```

<210> 32

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia LACI-D1

ES 2 559 927 T3

<400> 32

```

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

```

<210> 33

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia LACI-D2

<400> 33

```

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

```

<210> 34

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia LACI-D3

<400> 34

```

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

```

<210> 35

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia HKI B9

ES 2 559 927 T3

<400> 35

```

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

<210> 36

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia C alfa 3

<400> 36

```

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

<210> 37

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia TFPI-2 D1

<400> 37

```

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

<210> 38

<211> 61

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia TFPI-2 D2

ES 2 559 927 T3

<400> 38

```

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

<210> 39

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia TFPI-2 D3

<400> 39

```

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

<210> 40

<211> 59

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia APP-I

<400> 40

```

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

<210> 41

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia EpiNE7

ES 2 559 927 T3

<400> 41

```

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

<210> 42

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia BITI-E7-141

<400> 42

```

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

<210> 43

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia MUTT26A

<400> 43

```

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

<210> 44

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia MUTQE

ES 2 559 927 T3

<400> 44

```

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

```

<210> 45

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia MUT1619

<400> 45

```

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

```

<210> 46

<211> 62

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia EPI-HNE-1

<400> 46

```

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

```

<210> 47

<211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia EPI-HNE-2

ES 2 559 927 T3

<400> 47

```

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

<210> 48

<211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia EPI-HNE-3

<400> 48

```

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

<210> 49

<211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia EPI-HNE-4

<400> 49

```

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

<210> 50

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia DPI14 KR

ES 2 559 927 T3

<400> 50

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

<210> 51

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia DPI24 KR

<400> 51

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

<210> 52

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia DPI68 KR

<400> 52

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

<210> 53

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia DPI84 KR

<400> 53

ES 2 559 927 T3

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

<210> 54
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)
 <223> Can be Glu

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)
 <223> Can be Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala o. Thr

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)
 <223> Can be His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys
 o Gln

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)
 <223> Can be Ala, Ser, Gly, Met, Asn o Gln

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)
 <223> Can be Gly, Ser, Asp o Asn

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17)
 <223> Can be Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln o Thr

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)
 <223> Can be Leu, Gln o Ala

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19)
 <223> Can be Gln, Leu, Asn o. Ile

<220>
 <221> VARIANTE

ES 2 559 927 T3

<222> (21)
 <223> Can be Phe, Tyr, His o Ile

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (31)
 <223> Can be Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile
 o Thr

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (32)
 <223> Can be Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala,
 Gly o Val

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (34)
 <223> Can be Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly o Leu

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (35)
 <223> Can be Trp o Phe

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (39)
 <223> Can be Gly, Ala, Ser o Asp

<400> 54

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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His
 Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly
 Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
 Cys Thr Arg Asp (restos de aminoácidos 3-60 de la SEC ID N° 2),

5 en la que dicho polipéptido inhibe la calicreína, para uso en tratamiento o prevención de una respuesta inflamatoria sistémica en un individuo.

2. El polipéptido para uso según la reivindicación 1, en el que el individuo presenta fuga capilar extensa, traumatismo en los tejidos blandos o traumatismo en el tejido óseo.

3. El polipéptido para uso según la reivindicación 1, en el que el uso trata o evita el daño al sistema pulmonar del individuo.

10 4. El polipéptido para uso según la reivindicación 1, en el que el uso trata o evita el síndrome de dificultad respiratoria en adultos (ARDS) en el individuo.

5. El polipéptido para uso según la reivindicación 1, en el que el uso trata o evita el trastorno del riñón o circulación esplácnica en el individuo.

6. El polipéptido para uso según la reivindicación 1, en el que el uso trata o evita una coagulopatía en el individuo.

15 7. El polipéptido para uso según la reivindicación 1, en el que el uso trata o evita una deficiencia neurocognitiva en el individuo.

8. El polipéptido para uso según la reivindicación 1, en el que el uso trata o evita una apoplejía en el individuo.

9. El polipéptido para uso según la reivindicación 1, en el que el uso trata o evita insuficiencia renal en el individuo.

20 10. El polipéptido para uso según la reivindicación 1, en el que el uso trata o evita un infarto agudo de miocardio o daño del tejido cardíaco en el individuo.

11. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His
 Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly
 Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
 Cys Thr Arg Asp (restos de aminoácidos 3-60 de la SEC ID N° 2),

en la que dicho polipéptido inhibe la calicreína, para uso en tratamiento o prevención de pérdida de sangre perioperativa.

25 12. El polipéptido para uso según la reivindicación 2 o la reivindicación 11, en el que el individuo ha tenido una cirugía cardiotorácica.

13. El polipéptido para uso según la reivindicación 2 o la reivindicación 11, en el que el individuo ha tenido un procedimiento de injerto de derivación de arterias coronarias.

30 14. El polipéptido para uso según la reivindicación 2 o la reivindicación 11, en el que el individuo ha tenido una derivación cardiopulmonar.

15. El polipéptido para uso según la reivindicación 2 o la reivindicación 11, en el que el individuo ha tenido una artroplastia de cadera o ruptura del esternón.

16. El polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, para uso en asociación con una transfusión sanguínea.

35 17. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His
Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly
Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (restos de aminoácidos 3-60 de la SEC ID N° 2),

en la que dicho polipéptido inhibe la calicreína, para uso en tratamiento o prevención de isquemia.

18. El polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos:

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His
Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly
Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (restos de aminoácidos 3-60 de la SEC ID N° 2).

5

19. El polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos:

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala
Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile
Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys
Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEC ID N° 2).

10

20. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, y uno o más tampones, portadores y excipientes, farmacéuticamente aceptables, en la que la composición farmacéutica es para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.

21. La composición farmacéutica según la reivindicación 20, en la que la composición es un polvo liofilizado, seco.

22. La composición farmacéutica según la reivindicación 20, en la que la composición comprende disolución salina tamponada.

15

23. La composición farmacéutica según la reivindicación 22, en la que la composición comprende disolución salina tamponada de fosfato.

24. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en la que dicha composición farmacéutica comprende otro u otros compuestos farmacéuticamente activos más.

20

25. Un contenedor que comprende la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, en el que la composición farmacéutica es para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.

Figura 1

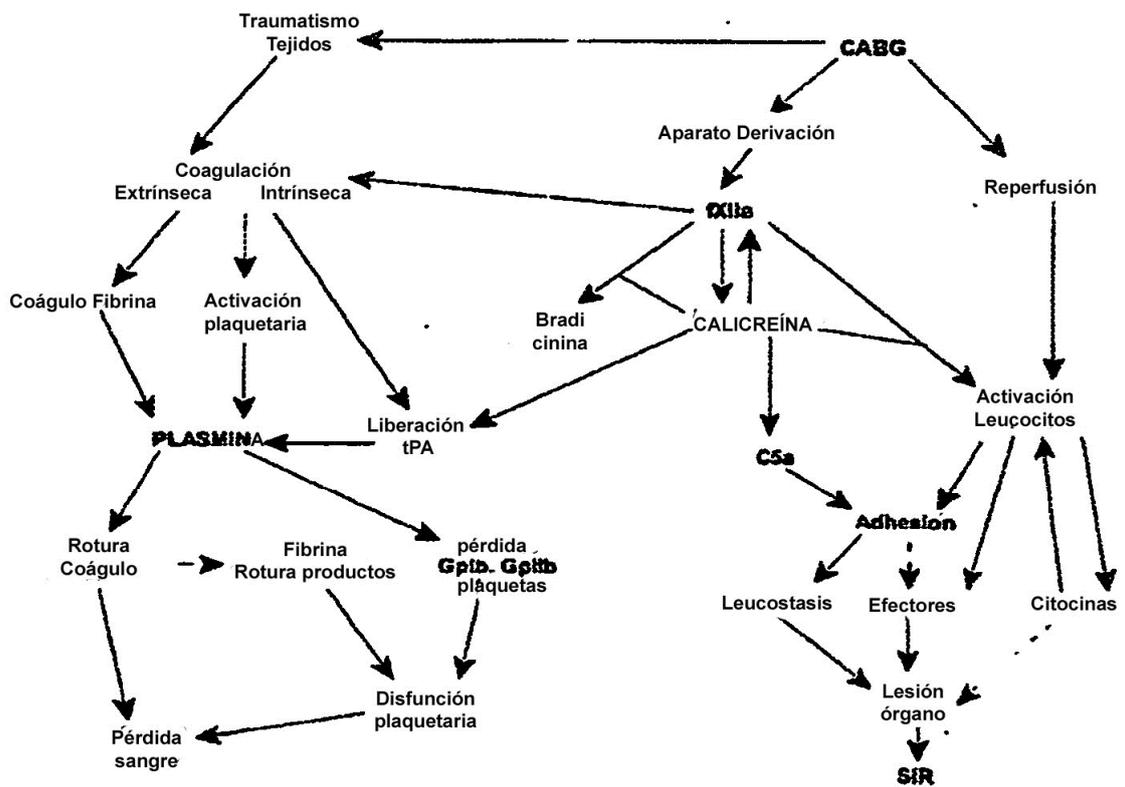


Figura 2

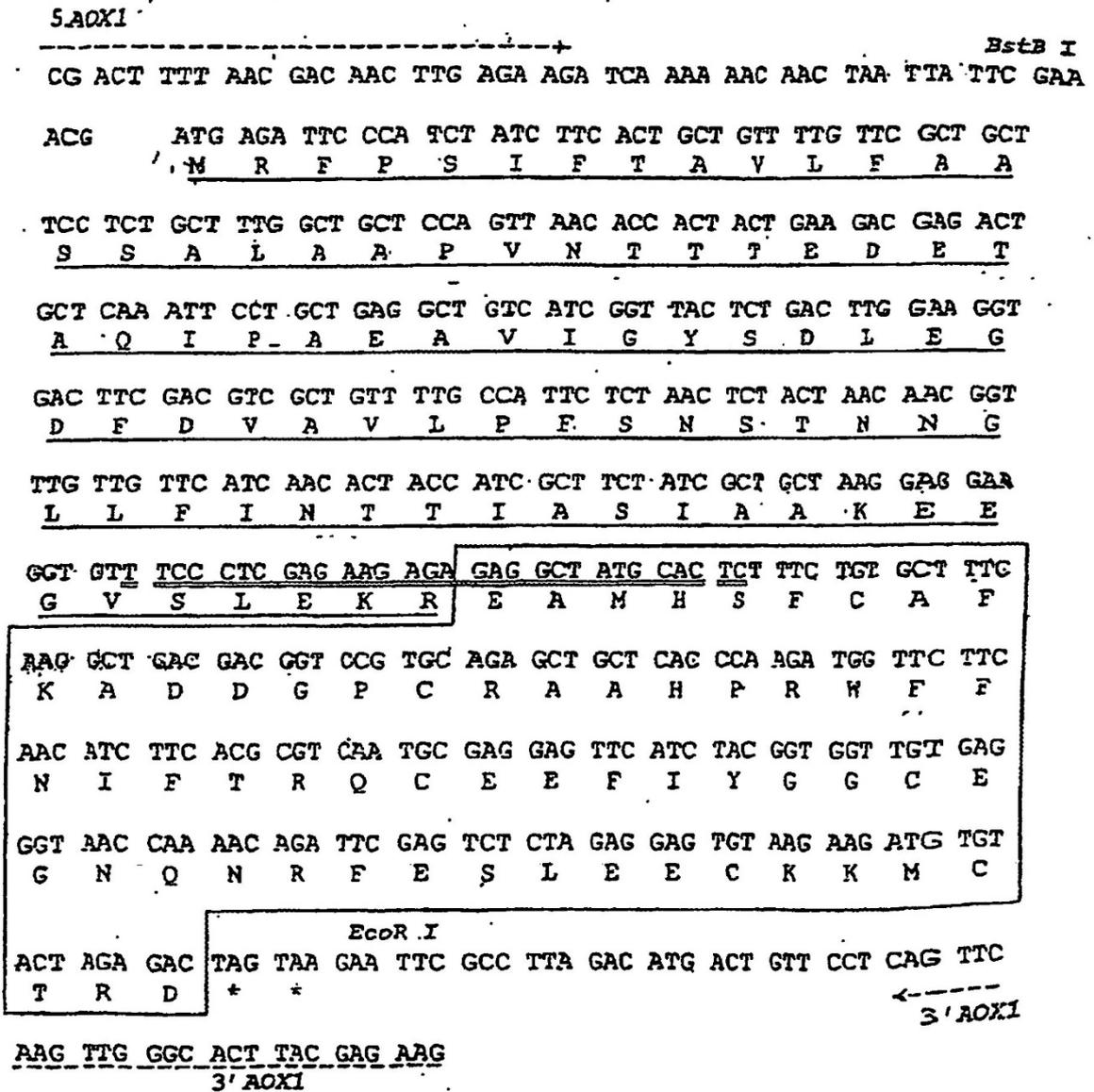


figura 3A

SEC ID 2: (aminoácidos 3-60) ----MHSFCAPKA-DDGPCRAAHPRWFFNI FTRQCEEFIYGG
 SEC ID 4: ----MHSFCAPKA-DDGPCANHLRFFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 5: ----MHSFCAPKA-DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 6: ----MHSFCAPKA-DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEQFTYGG
 SEC ID 7: ----MHSFCAPKA-DDGHCKASLPRFFFNIFTRQCEEFIYGG
 SEC ID 8: ----MHSFCAPKA-DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 9: ----MHSFCAPKA-DDGHCKGAHLRFFFNIFTRQCEEFIYGG
 SEC ID 10: ----MHSFCAPKA-DDGRCKGAHLRFFFNIFTRQCEEFIYGG
 SEC ID 11: ----MHSFCAPKA-DDGRCRGAHPRWFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 12: ----MHSFCAPKA-DDGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 13: ----MHSFCAPKA-DVGRCRGAHPRWFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 14: ----MHSFCAPKA-DVGRCRGAQPRFFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 15: ----MHSFCAPKA-DDGSCRAAHLRWFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 16: ----MHSFCAPKA-EGGSCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 17: ----MHSFCAPKA-DDGPCRGAHLRFFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 18: ----MHSFCAPKA-DDGHCRGALPRFFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 19: ----MHSFCAPKA-DSGNCRGNLPRFFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 20: ----MHSFCAPKA-DSGRCRGNHQRFFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 21: ----MHSFCAPKA-DGGRCAIQPRFFFNIFTRQCEEFYGG
 SEC ID 22: ----MHSFCAPKA-DDGRCRGAHPRWFFNIFTRQCEEFYGG
 BPTI (SEC ID 29): ----RPDFCLEPP-YTGPKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGG
 ITI-D1 (SEC ID 30): ----KEDSCQLGY-SAGPCMGMTSRYFYNGTSMACETFOYGG
 ITI-D2 (SEC ID 31): ----TVAACNLPI-VRGPCRAFIQLWAFDAVKGKCVLFPYGG
 LACI-D1 (SEC ID 32): ----MHSFCAPKA-DDGPCAIMKRFFFNIFTRQCEEFIYGG
 LACI-D2 (SEC ID 33): ----KPDFCFLEE-DPGICRGYITRYFYNNQTKQCFKYG
 LACI-D3 (SEC ID 34): ----GPSWCLTPA-DRGLCRANENRFYNSVIGKCRPFKYS
 HKI B9 (SEC ID 35): ----LPNVCAFPM-EKGPCQTYMTRWFFNFETGECELFA
 C-3 (SEC ID 36): ----ETDICKLPK-DEGTCRDFILKWYYDPNTKSCARFVYGG
 TFPI-2 D1 (SEC ID 37): ----NAEICLLPL-DYGPCRALLLRYYYDRYTQSCRQFLYGG
 TFPI-2 D2 (SEC ID 38): ----VPKVCRLQVSVDDQCEGSTEKYFFNLSSMTCEKFFSGG
 TFPI-2 D3 (SEC ID 39): ----IPSFYCSPK-DEGLCSANVTRYFYFNPRYRTCDAPTYTG
 APP-I (SEC ID 40): ----RNREVCSEA-ETGPCRAMISRWFYFDVTEGKCAPFFYGG
 EpiNE7 (SEC ID 41): ----RPDFCLEPP-YTGPCVAMFPRYFYNAKAGLCQTFVYGG
 BITI-E7-141 (SEC ID 42): ----RPDFCQLGY-SAGPCVAMFPRYFYNGTSMACQTFVYGG
 MUTT26A (SEC ID 43): ----RPDFCQLGY-SAGPCVAMFPRYFYNGASMACQTFVYGG
 MUTQE (SEC ID 44): ----RPDFCQLGY-SAGPCVAMFPRYFYNGTSMACETFOYGG
 MUT1619 (SEC ID 45): ----RPDFCQLGY-SAGPCVGMFSRYFYNGTSMACQTFVYGG
 EPI-HNE-1 (SEC ID 46): EAEARPDFCLEPP-YTGPCIAFFPRYFYNAKAGLCQTFVYGG
 EPI-HNE-2 (SEC ID 47): -----AACNLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFPYGG
 EPI-HNE-3 (SEC ID 48): -----AACNLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFPYGG
 EPI-HNE-4 (SEC ID 49): -----EACNLPI-VRGPCIAFFPRWAFDAVKGKCVLFPYGG
 DPI14 KR (SEC ID 50): --EAVREVCSEA-ETGPCIAFFPRWFYFDVTEGKCAPFFYGG
 DPI24 KR (SEC ID 51): --EANABICLLPL-DYGPCIAFFPRYYYDRYTQSCRQFLYGG
 DPI68 KR (SEC ID 52): --EAKPDFCFLEE-DPGICIGFFPRYFYNNQAKQCFRVYGG
 DPI84 KR (SEC ID 53): --EAEADICKLPK-DEGTCIAFFPRWYYDPNTKSCARFVYGG

Figura 3B

SEC ID 2:	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 4:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 5:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 6:	(cont.)	CAGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 7:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 8:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 9:	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 10:	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 11:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 12:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 13:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 14:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 15:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 16:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 17:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 18:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 19:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 20:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 21:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEC ID 22:	(cont.)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
BPTI (SEC ID 29):	(cont.)	CRAKR--NNFSAEDCMRTCGBA
ITI-D1 (SEC ID 30):	(cont.)	CMGNG--NNFVTRKECLQTCRTV
ITI-D2 (SEC ID 31):	(cont.)	CQGNQ--NKFYSEKECREYCGVP
LACI-D1 (SEC ID 32):	(cont.)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
LACI-D2 (SEC ID 33):	(cont.)	CLGNM--NNFETLEECKKNICEDG
LACI-D3 (SEC ID 34):	(cont.)	CGGNE--NNFTSKQCECLRACKKG
HKI B9 (SEC ID 35):	(cont.)	CGGNS--NNFLRKEKCEKFKFT
C-3 (SEC ID 36):	(cont.)	CGGNE--NKFQSQKECEKVCAPV
TPPI-2 D1 (SEC ID 37):	(cont.)	CEGNA--NNFYTWACDDACWRI
TPPI-2 D2 (SEC ID 38):	(cont.)	CHRNRIENRFPDEATCMGFCAK
TPPI-2 D3 (SEC ID 39):	(cont.)	CGGND--NNFVSREDCKRACAKA
APP-I (SEC ID 40):	(cont.)	CGGNR--NNFDTEEYCMVCGSA
EpiNE7 (SEC ID 41):	(cont.)	CMGNG--NNFKSAEDCMRTCGBA
BITI-E7-141 (SEC ID 42):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
MUTT26A (SEC ID 43):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
MUTQB (SEC ID 44):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
MUT1619 (SEC ID 45):	(cont.)	CMGNG--NNFVTEKDCLQTCRGA
EPI-HNE-1 (SEC ID 46):	(cont.)	CMGNG--NNFKSAEDCMRTCGBA
EPI-HNE-2 (SEC ID 47):	(cont.)	CQGNQ--NKFYSEKECREYCGVP
EPI-HNE-3 (SEC ID 48):	(cont.)	CQGNQ--NKFYSEKECREYCGVP
EPI-HNE-4 (SEC ID 49):	(cont.)	CQGNQ--NKFYSEKECREYCGVP
DPI14 KR (SEC ID 50):	(cont.)	CGGNR--NNFDTEEYCMVCGSA
DPI24 KR (SEC ID 51):	(cont.)	CEGNA--NNFYTWACDDACWRI
DPI68 KR (SEC ID 52):	(cont.)	CLGNM--NNFETLEECKKNICEDG
DPI84 KR (SEC ID 53):	(cont.)	CGGNE--NKFQSQKECEKVCAPV