

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 607**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 4/00 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2006 E 13157687 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2653542**

54 Título: **Procedimientos y composiciones relacionadas con el dominio Kunitz I mutante de TFPI-2**

30 Prioridad:

29.12.2005 US 754731 P

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

21.12.2016

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

BAJAJ, PAUL, S.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 594 607 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

Procedimientos y composiciones relacionadas con el dominio Kunitz I mutante de TFPI-2.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] El agente principalmente responsable de la fibrinólisis es la plasmina, la forma activada del plasminógeno. Muchas sustancias pueden activar el plasminógeno, incluyendo el factor de Hageman activado, estreptoquinasa, uroquinasa (uPA), activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) y calicreína plasmática (pKA). La pKA es tanto un activador de la forma zimógena de uroquinasa como un activador directo del plasminógeno.

[0002] La plasmina es indetectable en la sangre circulante normal, pero el plasminógeno, el zimógeno, está presente a aproximadamente 3 μ M. Una cantidad no medida adicional de plasminógeno está unida a fibrina y otros componentes de la matriz extracelular y las superficies celulares. La sangre normal contiene el inhibidor fisiológico de plasmina, inhibidor de plasmina α 2 (α 2-PI), a aproximadamente 2 μ M. La plasmina y el α 2-PI forman un complejo 1:1. La plasmina unida a la matriz o a la célula es relativamente inaccesible a la inhibición por α 2-PI. Por lo tanto, la activación de plasmina puede superar la capacidad de neutralización de α 2-PI causando un estado profibrinolítico.

[0003] La plasmina, una vez formada, degrada los coágulos de fibrina, algunas veces de forma prematura; digiere el fibrinógeno (el material de construcción de coágulos) alterando la hemostasia causando la formación de coágulos desmenuzables, que se lisan fácilmente a partir de los productos de degradación y la inhibición de la adhesión/agregación de plaquetas por los productos de degradación de fibrinógeno; interactúa directamente con las plaquetas para escindir glucoproteínas Ib y IIb/IIIa impidiendo la adhesión al endotelio lesionado en zonas de flujo sanguíneo de alto cizallamiento y alterando la respuesta de agregación necesaria para la formación de un tapón de plaquetas (ADEL86); inactiva proteolíticamente enzimas en la ruta de coagulación extrínseca promoviendo, además, un estado prolífico.

[0004] La fibrinólisis y fibrinogenólisis inapropiadas que conducen a hemorragia excesiva son una complicación frecuente de procedimientos quirúrgicos que requieren circulación extracorpórea, tal como derivación cardiopulmonar, y también se encuentra en terapia trombolítica y trasplante de órganos, particularmente de hígado. Otras afecciones clínicas caracterizadas por alta incidencia de diátesis hemorrágica incluyen cirrosis hepática, amiloidosis, leucemia promielocítica aguda y tumores sólidos. La restauración de la hemostasia requiere infusión de plasma y/o productos plasmáticos, lo que supone un riesgo de reacción inmunológica y exposición a patógenos, por ejemplo virus de la hepatitis y VIH.

[0005] Una pérdida de sangre muy grande puede resistir la resolución incluso con infusión masiva. Cuando se considera potencialmente letal, la hemorragia se trata con antifibrinolíticos tales como ácido ϵ -aminocaproico (Véase HOOV93) (EACA), ácido tranexámico o aprotinina (NEUH89). La aprotinina también se conoce como Trasylol y como Inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI). En lo sucesivo en el presente documento, la aprotinina se denominará "BPTI". El EACA y el ácido tranexámico solamente impiden que la plasmina se una a fibrina uniéndose a los dominios Kringle, dejando de este modo a la plasmina como una proteasa libre en el plasma. El BPTI es un inhibidor directo de plasmina y es el más eficaz de estos agentes. Debido al potencial para complicaciones trombóticas, toxicidad renal y, en el caso de BPTI, inmunogenicidad, estos agentes se usan con precaución y habitualmente se reservan como un "último recurso" (PUTT89). Todos estos tres agentes antifibrinolíticos carecen de especificidad y afinidad por una diana e interactúan con tejidos y órganos a través de rutas metabólicas sin caracterizar. Las dosis grandes requeridas debido a baja afinidad, efectos secundarios debidos a falta de especificidad y potencial para reacción inmunológica y toxicidad para órganos/tejidos aumentan contra el uso estos antifibrinolíticos de forma profiláctica para impedir la hemorragia o como una terapia postoperatoria rutinaria para evitar o reducir la terapia de transfusión. Por lo tanto, existe una necesidad de un antifibrinolítico seguro.

[0006] Una hemorragia excesiva puede ser el resultado de una actividad de coagulación deficiente, actividad fibrinolítica elevada o una combinación de las dos afecciones. En la mayoría de las diátesis hemorrágicas se debe controlar la actividad de plasmina. Se cree que el efecto clínicamente beneficioso del inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) en la reducción de la pérdida de sangre es el resultado de su inhibición de plasmina (Kd aproximadamente 0,3 nM) o de calicreína plasmática (Kd aproximadamente 100 nM) o de ambas enzimas.

[0007] Curiosamente, la reacción de hipersensibilidad inducida por BPTI se produce en aproximadamente del 1,2 al 2,7 por ciento de los pacientes expuestos de nuevo a aprotinina (30). De estas reacciones, el 50 por ciento

son potencialmente letales con una tasa de letalidad del 9 por ciento (30). Por lo tanto, una molécula humana que está modificada de forma selectiva para hacerla más potente es altamente deseable. También se espera que dicha molécula sea menos inmunógena. Recientemente se han descrito problemas de efectos secundarios y toxicidad para el uso de BPTI (Manago y col., N Engl J Med 2006; 354: 353-65). La textilina también se ha comparado con 5 aprotinina, sin embargo, la textilina es una proteína de serpiente y, por lo tanto, hay problemas de inmunogenicidad asociados con ella. (Pathophysiol Haemost Thromb. 2005; 34(4-5): 188-93 y Patente de Estados Unidos N° 7.070.969).

10 **[0008]** El documento WO 95/18830 da a conocer una variedad de polipéptidos que comprenden dominios Kunitz mutados, que potencialmente actúan como inhibidores de la plasmina humana.

[0009] Lo que se necesita en la técnica es un inhibidor de plasmina que sea tan potente (o más potente) que BPTI, pero que sea casi idéntico a un dominio de proteína humana, ofreciendo de este modo potencial terapéutico similar pero planteando menos potencial para antigenicidad.

15

RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] De acuerdo con el fin o los fines de esta invención, tal como se realiza y se describe ampliamente en el presente documento, esta invención, en un aspecto, se refiere a un polipéptido KD1, tal como se define en las 20 reivindicaciones, que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 92% de identidad con la SEC ID NO: 3, en la que, utilizando el sistema de numeración BPTI, (i) el aminoácido en el residuo 17 es un residuo de aminoácido cargado o polar; y (ii) el polipéptido inhibe la actividad de plasmina y presenta una menor actividad contra la coagulación en comparación con un polipéptido KD1 de tipo silvestre. Para referencia, también se da a 25 conocer en el presente documento la SEC ID N° 1 con una o más de las siguientes sustituciones: leucina se cambia a arginina o lisina en la posición 17 (numeración de BPTI); tirosina se cambia a ácido glutámico en la posición 46; tirosina se cambia a treonina en la posición 11; ácido aspártico se cambia a tirosina o ácido glutámico en la posición 10; alanina se cambia a metionina en la posición 16; alanina se cambia a glicina en la posición 16; alanina se cambia a serina en la posición 16.

30 **[0011]** En el presente documento también se dan a conocer los polipéptidos que inhiben la plasmina. En el presente documento también se dan a conocer polipéptidos que inhiben la plasmina y tienen actividad de anticoagulación reducida en comparación con el dominio Kunitz de tipo silvestre de TFPI-2. En el presente documento también se dan a conocer polipéptidos que son específicos como agentes antifibrinolíticos.

35 **[0012]** También se dan a conocer composiciones que comprenden los polipéptidos descritos en el presente documento.

[0013] También se dan a conocer ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos da a conocerlos en el 40 presente documento.

[0014] También se dan a conocer procedimientos de inhibición de al menos una actividad de plasmina que comprenden poner en contacto plasmina con una cantidad eficaz de un polipéptido da a conocerlo en el presente 45 documento.

[0015] También se da a conocer un procedimiento de tratamiento de un sujeto que necesita inhibición de una actividad de plasmina, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido da a conocerlo en el presente documento. Los ejemplos de enfermedades, trastornos, y tratamientos relacionados con la necesidad de inhibición de plasmina incluyen, aunque sin limitarse a, tumorigénesis, angiogénesis, remodelación ósea, cirugía, hemofilia, cirugía ortopédica, injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG) y síndrome de respuesta 50 inflamatoria sistémica (SIRS).

[0016] También se da a conocer un procedimiento de tratamiento de artritis reumatoide en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido da a conocerlo en el presente 55 documento.

[0017] También se da a conocer un procedimiento de identificación de un inhibidor de plasmina que comprende: modelar una estructura cristalina de plasmina con una variante de KD1; determinar la interacción entre la plasmina y la variante de KD1; en base a los resultados de la interacción, determinar si la variante de KD1 es un inhibidor de plasmina.

[0018] También se da a conocer un procedimiento de inhibición de plasmina en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del ácido nucleico da a conocer en el presente documento.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0019] Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

10

La figura 1 muestra un modelo de BPTI y KD1 (dominio Kunitz de TFPI-2) con plasmina. La parte superior muestra el alineamiento de secuencia de BPTI (SEC ID N° 5) KD1 (aminoácidos 10-67 de la SEC ID N° 1). La adición de 9 a la secuencia dará como resultado la numeración de KD1. En el modelo, la plasmina, el BPTI y el KD1 se muestran como cintas. Los residuos de plasmina se muestran con un sufijo p. A la izquierda está el complejo BPTI:plasmina y a la derecha está el complejo KD1:plasmina. Los residuos 9, 11, 22, 33 y 35 tanto en forma BPTI como KD1 forman el núcleo hidrófobo. El parche hidrófobo en BPTI, así como en KD1 constituido por los residuos 17, 8, 19 y 34, se muestra interactuando con el parche hidrófobo en plasmina constituido por los residuos 37{583}, 39{585} y 41{587}. El Glu39 del parche ácido en KD1 interactúa directamente con Arg175 {719} y posiblemente a través de moléculas de agua con Arg100 {644} y Arg221 {767} del parche básico en plasmina; dado que en BPTI el residuo 39 es Arg, dichas interacciones con plasmina no son posibles. El Tyr46 de KD1 interactúa con Lys60A {607} y Arg60D {610} en plasmina; dado que el residuo 46 es Lys en BPTI, dichas interacciones no son posibles. Arg17 en BPTI interactúa con Glu73 {623} en plasmina; dado que el residuo 17 es Leu en KD1, dichas interacciones no son posibles. Thr11 en BPTI establece un puente de H con la cadena lateral N de Gln192{738}; dado que el residuo 11 es Tyr en KD1, dichas interacciones no son posibles. El residuo 192 no se muestra en la figura. Tampoco se muestra el residuo 20, que es Arg tanto en BPTI como en KD1 que interactúa con el Glu60 {606} en plasmina. El residuo 15 P1 en BPTI es Lys que se muestra que interactúa con la cadena lateral O de Ser190 (736) y Asp189 {735} a través de una molécula de agua se muestra. El residuo 15 P1 en KD1 es Arg que también se muestra que interactúa con Ser190 y Asp 189 en plasmina. El sistema de numeración usado para plasmina es el de quimotripsina. Donde se producen interacciones, a la numeración de quimotripsina le sigue una letra mayúscula tal como 60A y 60D. Los números entre llaves representan la numeración del plasminógeno.

La figura 2 muestra experimentos de control que muestran la inhibición de Plasmina por BPTI en diferentes momentos (0,5 y 1 h) y concentraciones (0,5 y 1 mM) de sustrato (S-2251). El BPTI se une a plasmina con una constante de disociación aparente Kd de $1 \pm 0,5$. Además, no parece haber ningún desplazamiento, inducido por el sustrato, del inhibidor unido.

La figura 3 muestra la inhibición de plasmina por KD1 del tipo silvestre en diferentes momentos (0,5 y 1 h) y concentraciones de sustrato (0,5 y 1 mM) el KD1 de tipo silvestre se une a plasmina con una Kd aparente de 22 ± 2 nM. Además, no hay ningún desplazamiento del inhibidor inducido por el sustrato significativo. La figura 4 muestra la inhibición de plasmina por KD1 de tipo silvestre, R15K/L17R y R15K (obsérvese que en las figuras, R24K=R15K y L26R=L17R, donde R24K y L26R son numeración de KD1, y R15K y L26R son numeración de BPTI). El tiempo de incubación era de 1 h a 37°C y la concentración de sustrato era de 1 mM para las mediciones de actividad restantes. El mutante R15K/L17R inhibe la plasmina con una Kd aparente de 3 ± 1 nM. El mutante R24K inhibe la plasmina con una Kd de 9-11 nM. El KD1 de tipo silvestre inhibe la plasmina con una Kd de 22 nM, que es dos veces diferente de la Kd de 10 ± 2 nM para el mutante R24K. El L26R (L17R en numeración de BPTI) dio un valor de KD de 6 ± 2 , que es ~4 veces mejor que el KD1 de tipo silvestre.

La figura 5 muestra un ejemplo en el que el activador superficial más fosfolípido se mezcló con plasma humano normal a cantidades iguales (75 microlitros). Se añadieron diez microlitros de tampón que contenía inhibidor (KD1 de tipo silvestre, KD1 L26R o BPTI) y la muestra se incubó durante cinco minutos a 37°C. A continuación se añadieron setenta y cinco microlitros de CaCl_2 25 mM precalentados a 37°C y se anotó el tiempo necesario para formar el coágulo a través de la ruta intrínseca de coagulación de la sangre. Los datos muestran que KD1 de tipo silvestre y BPTI inhiben, cada uno, la ruta intrínseca de coagulación mientras que el mutante L26R (L17R en numeración BPTI) de KD1 es ineficaz a este respecto. Análogamente, se espera que la ruta extrínseca de coagulación no sea inhibida por el cambio de L26R.

La figura 6 muestra que tanto KD1 de tipo silvestre como L26R inhibían la plasmina de ratón eficazmente. El Kd1 de tipo silvestre y el mutante L26R son bastante eficaces para inhibir la plasmina de ratón con un valor de KD aparente de ~80 nM. La inhibición completa se obtuvo a 1 μM para KD1 tanto de tipo silvestre como L26R.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] La presente invención puede entenderse más fácilmente en referencia a la siguiente descripción

detallada de realizaciones preferidas de la invención y los ejemplos incluidos en ella y a las figuras y sus anteriores así como la siguiente descripción.

A. DEFINICIONES

5

[0021] Tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “uno” y “el/la” incluyen referentes en plural a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, referencia a “una molécula pequeña” incluye mezclas de una o más moléculas pequeñas, y similares.

10 **[0022]** Los intervalos pueden expresarse en el presente documento como de “aproximadamente” un valor particular, y/o a “aproximadamente” otro valor particular. Cuando dicho intervalo se expresa, otra realización incluye del un valor particular y/o al otro valor particular. Análogamente, cuando se expresan valores como aproximaciones, mediante el uso del antecedente “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otra realización. Se entenderá además que los valores extremos de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el
15 otro valor extremo, como independientemente del otro valor extremo.

[0023] Los términos “mayor”, “aumenta”, “eleva” o “elevación” se refieren a aumentos por encima de los niveles basales, por ejemplo, en comparación con un control. Los términos “bajo”, “menor”, “reduce” o “reducción” se refieren a disminuciones por debajo de niveles basales, por ejemplo, en comparación con un control.

20

B. PROCEDIMIENTOS DE USO

[0024] El inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) es un inhibidor de serina proteasa de tipo Kunitz. Inhibe la plasmina y está siendo usado en cirugía a corazón abierto y está recomendado en cirugía ortopédica para
25 minimizar la hemorragia preoperatoria y la administración de productos sanguíneos (1-5). Recientemente, el sistema de plasminógeno/plasmina también se ha implicado en el desarrollo de artritis reumatoide (6-10) así como en la remodelación y la resorción óseas (11-15) y tumorigénesis y angiogénesis (8, 16, 17).

[0025] El Inhibidor de la ruta del factor tisular humano-2 (TFPI-2), también conocido como inhibidor de serina
30 proteasa de la matriz o proteína placentaria 5, contiene los tres tipos de dominios Kunitz (similar a BPTI) en tándem con un corto extremo de aminoácidos y una cola C-terminal muy básica (18, 19). Diversas células, incluyendo queratinocitos, fibroblastos dérmicos, células de músculo liso, sincitiotrofoblastos, sinovioblastos y células endoteliales sintetizan y secretan TFPI-2 en la matriz extracelular (ECM) (20-23). El TFPI-2 se encuentra en tres formas debido a diferencias en la glucosilación con Mr 27.000, 30.000 y 32.000 (24). El primer dominio Kunitz (KD1)
35 de TFPI-2 humano es homólogo a BPTI y éste también inhibe la plasmina (25). Aunque KD1 es específico para inhibir la plasmina, los otros dos dominios Kunitz en TFPI-2 no tienen actividad inhibidora discernible. La cola básica C-terminal, sin embargo, puede anclar TFPI-2 a los restos de glucosamina en la ECM para inhibición localizada de plasmina.

40 **[0026]** Se han determinado la estructura cristalina de BPTI (26) y la de KD1 (27) con tripsina. La estructura cristalina del dominio proteasa de plasmina humana también se ha determinado (28). Usando estas estructuras como plantillas, los complejos de plasmina con BPTI así como plasmina y KD1 se han modelado con un alto grado de precisión. Las posiciones relativas de los inhibidores y el dominio proteinasa de plasmina se mantuvieron y solamente se realizaron ajustes secundarios en las cadenas laterales. Se observaron interacciones hidrófobas/de
45 van der Waals, puentes de hidrógeno e iónicas entre cada complejo proteinasa-inhibidor. Todas estas interacciones se tuvieron en consideración para evaluar cada complejo inhibidor-proteinasa, y se supuso que todos los potenciales donadores y aceptores de puentes de hidrógeno participarían en estas interacciones. Se excluyó el disolvente a granel del complejo proteinasa-inhibidor y, por consiguiente, se anticipó que los puentes de hidrógeno y las interacciones iónicas que pueden desempeñar un papel importante en la especificidad podían evaluarse con
50 precisión. Los protocolos para modelar estos complejos se han descrito previamente (29).

[0027] La figura 1 representa los residuos en BPTI y KD1 que interactúan con plasmina. A partir de los modelos presentados en la figura 1, cambiar Leu17 a Arg, y Tyr11 a Thr en KD 1 produce una molécula que tiene una afinidad y especificidad significativamente mayores hacia plasmina humana. Cambiar Tyr46 a Glu y Asp10 a Tyr
55 (o Glu) también aumenta la afinidad y la especificidad hacia la inhibición de plasmina. Por otro lado, cambiar Glu39 a Arg y Tyr46 a Lys puede dar como resultado una pérdida sustancial de afinidad de KD1 por la plasmina humana. Sistemáticamente, cambiar aquellos residuos que dan como resultado una ganancia de función tal como KD1 modificado con Thr11 y Arg17 produce una molécula que es más potente que BPTI y KD1 nativo. Dicha molécula también puede ser menos inmunógena que BPTI. La cola básica para la molécula selectiva también puede añadirse

al extremo C que contiene unos pocos residuos extra como enlazador de modo que su semi-vida en la matriz extracelular aumente. En el presente documento se dan a conocer procedimientos de inhibición de al menos una actividad de plasmina que comprenden poner en contacto plasmina con una cantidad eficaz de un polipéptido da a conocerlo en el presente documento.

5

[0028] Algunas formas de las moléculas y polipéptidos da a conocerlos pueden inhibir la plasmina pero tienen actividad de anticoagulación reducida en comparación con dominio Kunitz de TFPI-2 de tipo silvestre. Algunas formas de las moléculas y polipéptidos da a conocerlos también son específicas como agentes antifibrinolíticos. Por lo tanto, algunas formas de las moléculas y polipéptidos da a conocerlos son más activas como agentes

10

antifibrinolíticos pero ya no tienen actividad anticoagulante o tienen actividad anticoagulante reducida. Esta propiedad hace a dichas moléculas y polipéptidos bastante útiles para prevenir hemorragias.

[0029] También se da a conocer un procedimiento de tratamiento de un sujeto que necesita inhibición de una actividad de plasmina, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido da a conocerlo en el presente documento. Los ejemplos de enfermedades, trastornos y tratamientos relacionados con la necesidad de inhibición de plasmina incluyen, aunque sin limitarse a, tumorigénesis, angiogénesis, remodelación ósea, cirugía, hemofilia, cirugía ortopédica, injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG) y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). También se da a conocer un procedimiento de tratamiento de artritis reumatoide en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido da a conocerlo en el presente documento.

15

20

[0030] También se da a conocer un procedimiento de identificación de un inhibidor de plasmina que comprende: modelar una estructura cristalina de plasmina con una variante de KD1; determinar la interacción entre la plasmina y la variante de KD1; en base a la interacción, determinar si la variante de KD1 es un inhibidor de plasmina.

25

[0031] También se da a conocer un procedimiento de inhibición de plasmina en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del ácido nucleico da a conocerlo en el presente documento.

30

[0032] También se da a conocer un procedimiento de mostrar la eficacia de un compuesto para uso humano en un modelo en ratón de pérdida de sangre reducida. Se ha descubierto que KD1 de tipo silvestre y los mutantes da a conocerlos inhiben, ambos, la plasmina de ratón (véase el ejemplo 3). Por lo tanto, el mutante puede usarse para mostrar eficacia en un modelo en ratón de pérdida de sangre reducida.

35

[0033] Las proteínas de esta invención pueden producirse mediante cualquier técnica convencional, incluyendo síntesis no biológica mediante acoplamiento secuencial de componentes, por ejemplo aminoácidos, producción mediante técnicas de ADN recombinantes en células huésped adecuadas, y semisíntesis, por ejemplo, mediante la eliminación de secuencias no deseadas y acoplamiento de secuencias de sustitución sintéticas. Las proteínas da a conocerlas en el presente documento se producen preferentemente, de forma recombinante, en un huésped adecuado, tal como bacterias de los géneros *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Erwinia*, y levaduras de los géneros *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhinosporidium*, *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*, o células de mamífero cultivadas tales como COS-1. Los huéspedes más preferidos son microorganismos de las especies *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* y *Yarrowia lipolytica*. Cualquier promotor que sea funcional en la célula huésped puede usarse para controlar la expresión génica.

40

45

[0034] Las proteínas pueden secretarse y pueden obtenerse a partir de medio acondicionado. La secreción en la ruta preferida, dado que es más probable que las proteínas se plieguen correctamente y puedan producirse en medio acondicionado con pocos contaminantes. No se requiere secreción.

[0035] Pueden usarse proteínas diseñadas para carecer de sitios de glucosilación unidos a N para reducir el potencial de antigenicidad de glucogrupos, y de modo que proteínas equivalentes puedan expresarse en una amplia diversidad de organismos incluyendo: 1) *E. coli*, 2) *B. subtilis*, 3) *P. pastoris*, 4) *S. cerevisiae*, y 5) células de mamífero.

50

[0036] Existen varios medios para reducir el problema de células huésped que producen proteasas que degradan el producto recombinante. La sobreexpresión de la peptidasa señal de *B. subtilis* en *E. coli* conduce a una expresión aumentada de una proteína de fusión heteróloga. También se ha descrito que la adición de PMSF (un inhibidor de serina proteasas) al medio de cultivo mejoraba el rendimiento de una proteína de fusión.

55

[0037] Otros factores que pueden afectar a la producción de estas y otras proteínas da a conocerse en el presente documento incluyen: 1) uso de codones (se prefiere codones de optimización para el huésped), 2) secuencia señal, 3) secuencia de aminoácidos en sitios de procesamiento pretendidos, presencia y localización de enzimas de procesamiento, delección, mutación o inhibición de diversas enzimas que podrían alterar o degradar el producto manipulado y mutaciones que hacen al huésped más permisivo en secreción (se prefieren huéspedes de secreción permisiva).

[0038] Las obras de referencia sobre los principios generales de tecnología de ADN recombinante incluyen Watson y col., *Molecular Biology of the Gene*, Volúmenes I y II, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, Calif. (1987); Darnell y col., *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, Inc., Nueva York, N.Y. (1986); Lewin, *Genes II*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (1985); Old, y col., *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*, 2ª edición, University of California Press, Berkeley, Calif. (1981); Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); y Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, N.Y., (1987, 1992).

[0039] Puede usarse cualquier procedimiento adecuado para ensayar los compuestos de esta invención. Scatchard (*Ann NY Acad Sci* (1949) 51: 660-669) describió un procedimiento convencional de medición y análisis de la unión que es aplicable a la unión de proteínas. Este procedimiento requiere proteína relativamente pura y la capacidad de distinguir proteína unida de no unida.

[0040] Un segundo procedimientos apropiado de medición de Kd es medir la actividad inhibidora contra la enzima. Si la Kd a medir está en el intervalo de 1 nM a 1 μ M, este procedimiento requiere sustratos cromógenos o fluorógenos y decenas de microgramos a miligramos de inhibidor relativamente puro. Para las proteínas de esta invención, que tienen una Kd en el intervalo de 5 nM a 50 pM, bastan de nanogramos a microgramos de inhibidor. Cuando se usa este procedimiento, la competición entre el inhibidor y el sustrato enzimático puede dar una Ki medida que es mayor que la auténtica Ki.

[0041] Un tercer procedimiento de determinación de la afinidad de una proteína por un segundo material es hacer que la proteína sea presentada en un paquete genético, tal como M13, y medir la capacidad de la proteína para adherirse al "segundo material" inmovilizado. Este procedimiento es altamente sensible, dado que los paquetes genéticos pueden amplificarse. Los inhibidores de afinidad conocida por la proteasa se usan para establecer perfiles convencionales contra los cuales se valoran otros inhibidores presentados en fagos. También puede usarse cualquier otro procedimiento adecuado de medición de la unión de proteínas.

[0042] Las proteínas de esta invención pueden tener una Kd para plasmina de, como máximo, aproximadamente 5 nM, como máximo, aproximadamente 300 pM o 100 pM o menos. La unión puede ser inhibidora, de modo que Ki sea la misma que Kd. La Ki de QS4 para plasmina es de aproximadamente 2 nM. La Ki de SPI11 para plasmina es de aproximadamente 88 pM.

[0043] Las composiciones da a conocerse en el presente documento pueden administrarse *in vivo* en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, es decir, el material puede administrarse a un sujeto, junto con el ácido nucleico o vector, sin causar efectos biológicos indeseables algunos o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. El vehículo se seleccionaría de forma natural para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo y para minimizar cualesquiera efectos secundarios adversos en el sujeto, tal como conocería bien un experto en la materia.

[0044] Las composiciones pueden administrarse por vía oral, por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa), mediante inyección intramuscular, mediante inyección intraperitoneal, por vía transdérmica, por vía extracorporal, por vía tópica o similares, incluyendo administración intranasal tópica o administración mediante inhalante. Tal como se usa en el presente documento, "administración intranasal tópica" significa administración de las composiciones en el interior de la nariz y los pasajes internos a través de una o ambas de las fosas nasales y puede comprender la administración mediante un mecanismo de pulverización o mecanismo de gotas, o a través de aerosolización del ácido nucleico o vector. La administración de las composiciones mediante inhalante puede ser a través de la nariz o la boca mediante administración mediante un mecanismo de pulverización o gotas. La administración también puede ser directamente a cualquier zona del aparato respiratorio (por ejemplo, los pulmones) mediante intubación. La cantidad exacta de las composiciones requeridas variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, la edad, el peso y el estado general del sujeto, la gravedad del trastorno alérgico que está siendo tratado,

el ácido nucleico o vector particular usado, su modo de administración y similares. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada composición. Sin embargo, una cantidad apropiada puede ser determinada por un experto en la materia usando solamente experimentos rutinarios, dadas las enseñanzas en el presente documento.

5

[0045] La administración parenteral de la composición, si se usa, se caracteriza generalmente por inyección. Pueden prepararse inyectables de formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución de suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Un enfoque revisado más recientemente para administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación lenta o liberación sostenida de modo que se mantenga una dosificación constante. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 3.610.795.

10

[0046] Los materiales pueden estar en solución, suspensión (por ejemplo, incorporados en micropartículas, liposomas o células). Estos pueden dirigirse a un tipo de célula particular mediante anticuerpos, receptores o ligandos del receptor. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas a tejido tumoral (Senter, y col., *Bioconjugate Chem.*, 2: 447-451, (1991); Bagshawe, K.D., *Br. J. Cancer*, 60: 275-281, (1989); Bagshawe, y col., *Br. J. Cancer*, 58: 700-703, (1988); Senter, y col., *Bioconjugate Chem.*, 4: 3-9, (1993); Battelli, y col., *Cancer Immunol. Immunother.*, 35: 421-425, (1992); Pietersz y McKenzie, *Immunolog. Reviews*, 129: 57-80, (1992); y Roffler, y col., *Biochem. Pharmacol.*, 42: 2062-2065, (1991)). Vehículos tales como "furtivos" y otros liposomas conjugados a anticuerpos (incluyendo dirección de fármacos mediada por lípidos a carcinoma de colon), dirección de ADN mediada por receptores a través de ligandos específicos de células, dirección a tumores dirigida por linfocitos, y dirección retroviral terapéutica altamente específica a células de glioma murino *in vivo*. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas a tejido tumoral (Hughes y col., *Cancer Research*, 49: 6214-6220, (1989); y Litzinger y Huang, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104: 179-187, (1992)). En general, los receptores están implicados en rutas de endocitosis, constitutivas o inducidas por ligando. Estos receptores se agrupan en pozos recubiertos de clatrina, la célula mediante vesículas recubiertas de clatrina, pasan a través de un endosoma acidificado en el que los receptores se clasifican, y a continuación se reciclan a la superficie celular, se vuelven almacenados de forma intracelular o se degradan en los lisosomas. Las rutas de internalización sirven para diversas funciones, tales como captación de nutrientes, eliminación de proteínas activadas, aclaramiento de macromoléculas, entrada oportunista de virus y toxinas, disociación y degradación de ligando y regulación a nivel del receptor. Muchos receptores siguen más de una ruta intracelular, dependiendo del tipo de célula, la concentración del receptor, el tipo de ligando, la valencia del ligando, y la concentración del ligando. Se han revisado mecanismos moleculares y celulares de endocitosis mediada por receptores (Brown y Greene, *DNA and Cell Biology* 10: 6, 399-409 (1991)).

35

[0047] Las composiciones da a conocerdas en el presente documento pueden usarse de forma terapéutica en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0048] Los vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19ª ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995. Típicamente, una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable se usa en la formulación para hacer a la formulación isotónica. Los ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen, aunque sin limitarse a, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es, preferentemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Vehículos adicionales incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Será evidente para los expertos en la materia que algunos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la ruta de administración y la concentración de composición que está siendo administrada.

50

[0049] Los vehículos farmacéuticos son conocidos por los expertos en la materia. Estos serían de la manera más típica vehículos convencionales para administración de fármacos a seres humanos, incluyendo soluciones tales como agua estéril, solución salina y soluciones tamponadas a pH fisiológico. Las composiciones pueden administrarse por vía intramuscular o por vía subcutánea. Otros compuestos se administrarán de acuerdo con procedimientos convencionales usados por los expertos en la materia.

55

[0050] Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos y similares además de la molécula de elección. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más ingredientes activos tales como agentes antimicrobianos, agentes

antiinflamatorios, anestésicos y similares.

- [0051]** La composición farmacéutica puede administrarse en una serie de maneras dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico, y de la zona a tratar. La administración puede ser por vía tópica (incluyendo por vía oftálmica, por vía vaginal, por vía rectal, por vía intranasal), por vía oral, por inhalación o por vía parenteral, por ejemplo mediante goteo intravenoso, inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Los anticuerpos de animales conocidos pueden administrarse por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intracavitaria o por vía transdérmica.
- 10 **[0052]** Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer, o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluido y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. Conservantes y otros aditivos también pueden estar presentes tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, y similares.
- 20 **[0053]** Las formulaciones para administración tópica pueden incluir pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, pulverulentas u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables.
- [0054]** Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sobrecitos o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, auxiliares de dispersión o aglutinantes.
- 30 **[0055]** Algunas de las composiciones pueden administrarse potencialmente como una sal de adición de ácidos o de bases farmacéuticamente aceptable, formada mediante reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido fumárico, o mediante reacción con una base inorgánica tal como hidróxido sódico, hidróxido de amonio, hidróxido potásico, y bases orgánicas tales como mono-, di-, triálquil y arilaminas y etanolaminas sustituidas.
- 35 **[0056]** Las dosificaciones y programas eficaces para administrar las composiciones pueden determinarse empíricamente, y la realización de dichas determinaciones está dentro del alcance de la técnica. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son aquellos lo suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el que los síntomas del trastorno están afectados. La dosificación no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas, y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, el estado, el sexo y el grado de la enfermedad en el paciente, la vía de administración o si otros fármacos están incluidos en el régimen, y puede ser determinada por un experto en la materia. La dosificación puede ser ajustada por el facultativo individual en caso de contraindicaciones cualesquiera. La dosificación puede variar, y puede administrarse en una o más administraciones de la dosis al día, durante uno o varios días. Puede encontrarse orientación en la bibliografía para dosificaciones apropiadas para clases dadas de productos farmacéuticos.
- 40 **[0057]** Las proteínas de esta invención pueden aplicarse in vitro a cualquier muestra adecuada que pudiera contener plasmina para medir la plasmina presente. Para hacer esto, el ensayo puede incluir un Sistema Productor de Señales (SPS) que proporciona una señal detectable que depende de la cantidad de plasmina presente. La señal puede detectarse de forma visual o instrumental. Las posibles señales incluyen la producción de productos coloreados, fluorescentes o luminiscentes, la alteración de las características de absorción o emisión de radiación mediante un componente o producto del ensayo, y precipitación o aglutinación de un componente o producto.
- 50 **[0058]** El componente del SPS asociado de manera más íntima con el reactivo de diagnóstico se denomina la "marca". Una marca puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo, una enzima, una coenzima, un sustrato enzimático, un compuesto electrodenso, o una partícula aglutinable. Un isótopo radiactivo puede detectarse mediante el uso de, por ejemplo, un contador γ o un contador de centelleo o mediante autorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles son ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{14}C y, preferentemente, ^{125}I . También es posible marcar un

compuesto con un compuesto fluorescente. Cuando el compuesto marcado de forma fluorescente es expuesto a luz de la longitud de onda apropiada, su presencia puede ser detectada. Entre los compuestos de marcado fluorescente usados más habitualmente están isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina. Como alternativa, metales emisores de fluorescencia, tales como ^{125}Eu u otro lantánido, pueden fijarse a la proteína de unión usando grupos quelantes de metales tales como ácido dietilnitriaminopentaacético o ácido etilendiaminotetraacético. Las proteínas también pueden marcarse de forma detectable mediante acoplamiento a un compuesto quimioluminiscente, tales como luminol, isoluminol, éster teromático de acridinio, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato. Del mismo modo, un compuesto bioluminiscente, tal como luciferina, luciferasa y acuorina, puede usarse para marcar la proteína de unión. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Se prefieren marcas enzimáticas, tales como peroxidasa de rábano rústico y fosfatasa alcalina.

[0059] Hay dos tipos básicos de ensayos: heterogéneos y homogéneos. En los ensayos heterogéneos, la unión de la molécula de afinidad al analito no afecta a la marca; por lo tanto, para determinar la cantidad de analito, la marca unida debe separarse de la marca libre. En los ensayos homogéneos, la interacción afecta a la actividad de la marca, y el analito puede medirse sin separación.

[0060] En general, una proteína de unión a plasmina (PBP) puede usarse para diagnóstico, de la misma manera que se usa un anticuerpo antiplasmina. Por lo tanto, dependiendo del formato del ensayo, puede usarse para ensayar plasmina o, mediante inhibición competitiva, otras sustancias que se unen a plasmina.

[0061] La muestra será normalmente un fluido biológico, tal como sangre, orina, linfa, semen, leche o líquido cefalorraquídeo, o un derivado de los mismos, o un tejido biológico, por ejemplo, una sección u homogenado tisular. La muestra podría ser cualquier cosa. Si la muestra es un fluido o tejido biológico, puede ser tomada de un ser humano u otro mamífero, vertebrado o animal, o de una planta. La muestra preferida es sangre, o una fracción o derivado de la misma.

[0062] En una realización, la proteína de unión a plasmina (PBP) está inmovilizada, y a la plasmina en la muestra se le permite competir con una cantidad conocida de un análogo de plasmina marcado o marcable de forma específica. El "análogo de plasmina" es una molécula capaz de competir con plasmina por la unión a la PBP, que incluye la propia plasmina. Puede estar ya marcado, o puede marcarse posteriormente uniéndose específicamente a la marca a un resto que diferencie al análogo de plasmina de la plasmina. Las fases se separan, y se cuantifica el análogo de plasmina marcado en una fase.

[0063] En un "ensayo en sándwich", se emplean tanto un agente de unión a plasmina (PBA) insolubilizado, como un PBA marcado. El analito de plasmina es capturado por el PBA insolubilizado y es etiquetado por el PBA marcado, formando un complejo terciario. Los reactivos pueden añadirse a la muestra en cualquier orden. Los PBA pueden ser iguales o diferentes, y solamente es necesario que un PBA sea una PBP según esta invención (el otro puede ser, por ejemplo, un anticuerpo). La cantidad de PBA marcado en el complejo terciario es directamente proporcional a la cantidad de plasmina en la muestra.

[0064] Las dos realizaciones descritas anteriormente son ambos ensayos heterogéneos. Un ensayo homogéneo requiere solamente que la marca resulte afectada por la unión de la PBP a plasmina. El analito de plasmina puede actuar como su propia marca si se usa un inhibidor de plasmina como reactivo de diagnóstico.

[0065] Una marca puede estar conjugada, directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un anticuerpo anti-PBP marcado), covalentemente (por ejemplo, con SPDP) o no covalentemente, a la proteína de unión a plasmina, para producir un reactivo de diagnóstico. Análogamente, la proteína de unión a plasmina puede estar conjugada a un soporte en fase sólida para formar un reactivo de diagnóstico ("de captura") en fase sólida. Los soportes adecuados incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, Nylon, amilasas y magnetita. El vehículo puede ser soluble en cierta medida o insoluble para los fines de esta invención. El material de soporte puede tener cualquier estructura, siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a plasmina.

[0066] Un dominio Kunitz que se une muy estrechamente a plasmina puede usarse para imaginología in vivo. La imaginología de diagnóstico de focos de enfermedad se consideraba una de las mayores oportunidades comerciales para anticuerpos monoclonales, pero esta oportunidad no se ha conseguido. A pesar de un esfuerzo considerable, solamente se han aprobado dos agentes de imaginología a base de anticuerpos monoclonales. Los decepcionantes resultados obtenidos con anticuerpos monoclonales se deben en gran medida a: i) afinidad y/o especificidad inadecuadas; ii) mala penetración en sitios diana; iii) lento aclaramiento de sitios no diana; iv)

inmunogenicidad; y v) coste de producción elevado y mala estabilidad.

[0067] Estas limitaciones han conducido al desarrollo de agentes de imaginología de base peptídica. Aunque potencialmente resuelven los problemas de mala penetración o lento aclaramiento, es improbable que los agentes de imaginología de base peptídica posean afinidad, especificada y estabilidad in vivo adecuadas para ser útiles en la mayoría de las aplicaciones.

[0068] Las proteínas manipuladas son adecuadas de forma única para los requisitos para un agente de imaginología. En particular, la afinidad y especificidad extraordinarias que pueden obtenerse manipulando dominios proteicos de origen humano, estables y pequeños que tienen velocidades y mecanismos de aclaramiento in vivo conocidos, se combinan para proporcionar resultados más tempranos y más fiables, menos toxicidad/efectos secundarios, un menor coste de producción y almacenamiento, y mayor comodidad de preparación de la marca. De hecho, es posible conseguir el objetivo de imaginología en tiempo real con agentes de imaginología de proteínas manipuladas. Las proteínas de unión a plasmina, por ejemplo SPI11, pueden ser útiles para localizar sitios de hemorragia interna.

[0069] La proteína de unión radiomarcada puede administrarse al sujeto humano o animal. La administración es típicamente por inyección, por ejemplo, intravenosa o arterial u otros medios de administración en una cantidad suficiente para permitir la posterior imaginología dinámica y/o estática usando dispositivos de radiodetección adecuados. La dosificación es la cantidad más pequeña capaz de proporcionar una imagen eficaz desde el punto de vista del diagnóstico, y puede determinarse mediante medios convencionales en la técnica, usando agentes de radioimaginología conocidos.

[0070] Típicamente, la imaginología se lleva a cabo en todo el cuerpo del sujeto, o en esa parte del cuerpo u órgano relevante para la afección o enfermedad en estudio. La proteína de unión radiomarcada se ha acumulado. La cantidad de proteína de unión radiomarcada acumulada en un punto en el tiempo dado, en órganos diana relevantes puede cuantificarse a continuación.

[0071] Un dispositivo de radiodetección particularmente adecuado es una cámara de centelleo, tal como una cámara γ . El dispositivo de detección en la cámara detecta y registra (y opcionalmente digitaliza) la desintegración radiactiva. La información digitalizada puede analizarse de cualquier manera adecuada, muchas de las cuales se conocen en la técnica. Por ejemplo, un análisis de tiempo-actividad puede ilustrar la captación a través del aclaramiento de la proteína de unión radiomarcada por los órganos diana con el tiempo.

[0072] Diversos factores se tienen en consideración para seleccionar un radioisótopo apropiado. El isótopo se selecciona: para permitir una resolución de buena calidad después de la imaginología, para que sean seguros para uso de diagnóstico en seres humanos y animales y, preferentemente, para tener una corta semi-vida para reducir la cantidad de radiación recibida por el cuerpo. El radioisótopo usado debe ser, preferentemente, farmacológicamente inerte, y las cantidades administradas no deben tener ningún efecto fisiológico sustancial. La proteína de unión puede estar radiomarcada con diferentes isótopos de yodo, por ejemplo 123I, 125I o 131I (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.609.725). La cantidad de marcado debe monitorizarse adecuadamente.

[0073] En aplicaciones a sujetos humanos, puede ser deseable usar radioisótopos diferentes de 125I para marcado para reducir la exposición de dosimetría total del cuerpo y para optimizar la detectabilidad de la molécula marcada. Considerando la disponibilidad clínica lista para su uso en seres humanos, las radiomarcas preferidas incluyen: 99mTc, 67Ga, 68Ga, 90Y, 111In, 113mIn, 123I, 186Re, 188Re o 211At. La proteína radiomarcada puede prepararse mediante diversos procedimientos. Estos incluyen radiohalogenación mediante el método de cloramina-T o lactoperoxidasa y posterior purificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, por ejemplo, véase Gutkowska y col en "Endocrinology and Metabolism Clinics of America: (1987) 16 (1): 183. Pueden usarse otros procedimientos de radiomarcado, tales como IODOBEADS™.

[0074] Una proteína radiomarcada puede administrarse mediante cualquier medio que permita que el agente activo alcance el sitio de acción del agente en un mamífero. Dado que las proteínas están sometidas a digestión cuando se administran por vía oral, habitualmente se usaría administración parenteral, es decir, intravenosa subcutánea, intramuscular, para optimizar la absorción.

[0075] Las proteínas de unión a plasmina de esta invención también pueden usarse para purificar plasmina de un fluido, por ejemplo, sangre. Para este fin, la PBP se inmoviliza preferentemente sobre un soporte insoluble. Dichos soportes incluyen aquellos ya mencionados como útiles para preparar reactivos de diagnóstico en fase

sólida.

[0076] Las proteínas pueden usarse como marcadores de peso molecular para referencia en la separación o purificación de proteínas. Puede ser necesario desnaturalizar las proteínas para que sirvan como marcadores de peso molecular. Una segunda utilidad general para las proteínas es el uso de proteína hidrolizada como fuente de nutrientes. Las proteínas también pueden usarse para aumentar la viscosidad de una solución.

[0077] La proteína de esta invención puede usarse para cualquiera de los fines anteriores, así como para fines de diagnóstico terapéutico tal como se ha descrito adicionalmente anteriormente en esta memoria descriptiva.

[0078] La síntesis química de polipéptidos es conocida en la técnica, y procedimientos de síntesis de polipéptidos en fase sólida se describen bien en las siguientes referencias: (Merrifield, J Amer Chem Soc 85: 2149-2154 (1963); Merrifield, Science 232: 341-347 (1986); Wade y col., Biopolymers 25: S21-S37 (1986); Fields, Int J Polypeptide Prot Res 35: 161 (1990); MilliGen Report N° 2 y 2a, Millipore Corporation, Bedford, Mass., 1987) Ausubel y col, *supra*, y Sambrook y col, *supra*. Tan y Kaiser (Biochemistry, 1977, 16: 1531-41) sintetizaron BPT1 y un homólogo hace dieciocho años.

[0079] Tal como se conoce en la técnica, dichos procedimientos implican bloquear o proteger grupos funcionales reactivos, tales como grupos amino, carboxilo y tio libres. Después de la formación del enlace polipeptídico, los grupos protectores se eliminan. Por lo tanto, la adición de cada residuo de aminoácido requiere varias etapas de reacción para proteger y desproteger. Los procedimientos actuales utilizan síntesis en fase sólida, en la que el aminoácido C-terminal está enlazado covalentemente a partículas de resina insolubles que pueden filtrarse. Los reactantes se eliminan lavando las partículas de resina con disolventes apropiados usando una máquina automatizada. Diversos procedimientos, incluyendo el método "tBoc" y el método "Fmoc" son bien conocidos en la técnica. Véase, *inter alia*, Atherton y col., J Chem Soc Perkin Trans 1: 538-546 (1981) y Sheppard y col, Int J Polypeptide Prot Res 20: 451-454 (1982).

C. COMPOSICIONES

[0080] Se dan a conocer los componentes a usar para preparar las composiciones da a conocerdas, así como las propias composiciones a usar en los procedimientos da a conocerdos en el presente documento. Estos y otros materiales se dan a conocer en el presente documento, y se entiende que, cuando se dan a conocer combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc., de estos materiales que, aunque puede no da a conocerse explícitamente una referencia específica de cada diversas combinaciones individual y colectiva y permutación de estos compuestos, cada uno se contempla de forma específica y se describe en el presente documento. Por ejemplo, si una secuencia de aminoácidos particular se da a conocer y describe y una serie de modificaciones que pueden realizarse a una serie de lugares dentro de la secuencia pueden realizarse y describirse, se contemplan específicamente todas y cada combinación y permutación del aminoácido y las modificaciones son posibles a menos que se indique específicamente lo contrario. Por lo tanto, si se dan a conocer una clase de moléculas A, B y C, así como una clase de moléculas D, E y F y se da a conocer un ejemplo de una molécula de combinación, A-D, entonces incluso aunque cada una no se mencione individualmente, cada una es contemplada individual y colectivamente lo que significa que las combinaciones, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E y C-F se consideran da a conocerdas. Del mismo modo, cualquier subconjunto o combinación de estas también se da a conocer. Por lo tanto, por ejemplo, el subgrupo de A-E, B-F y C-E se consideraría da a conocerdo. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta solicitud incluyendo, aunque sin limitarse a, etapas en procedimientos de preparación y de uso de las composiciones da a conocerdas. Por lo tanto, si existen diversas etapas adicionales que pueden realizarse se entiende que cada una de estas etapas adicionales puede realizarse con cualquier realización específica o combinación de realizaciones de los procedimientos da a conocerdos.

[0081] En el presente documento se da a conocer: para referencia, un polipéptido que comprende la SEC ID N° 1 (Dominio de Tipo Kunitz 1, o KD1). La SEC ID N° 1 se representa mediante la siguiente: DAAQEPTGNNAEICLLPLDY GPCRALLRYYYYDRYQTSCRQFLYGGCEGNANNFYTWACDDACWRIEKVPKV.

[0082] También se dan a conocer: para referencia, polipéptidos que comprenden la SEC ID N° 2 (en la que la leucina en la posición 17 tal como se ha numerado en BPT1 se ha cambiado a arginina): DAAQEPTGNNAEICLL PLDYGPCRARLLRYYYYDRYQTSCRQFLYGGCEGNANNFYTWACDDACWRIEKVPKV.

[0083] También se da a conocer la SEC ID N° 3, que es un polipéptido más corto que la SEC ID N° 1, y también comprende el cambio en la posición 17 (L17R): NAEICLLPLDYGPCRAR

LLRYYYDRYTQSCRQFLYGGCEGNANNFYTWACDDACWRIE.

[0084] También se dan a conocer: para referencia, polipéptidos que comprenden la SEC ID N° 4 (en la que la leucina en la posición 17 tal como se ha numerado en BPTI se ha cambiado a arginina y la alanina en la posición 16 se ha cambiado a metionina): DAAQEPTGNNAEICLLPLDYGPC
RMRLRYYYDRYTQSCRQFLYGGCEGNANNFYTWACDDACWRIEKVPKV.

[0085] Se ha descubierto que un cambio del aminoácido hidrófobo en la posición 17 (leucina) a un aminoácido cargado tal como arginina o lisina, afecta a la actividad de anticoagulación de KD1 sin reducir significativamente la inhibición de plasmina. Son particularmente útiles dichos polipéptidos mutantes donde la actividad de anticoagulación es eliminada y la inhibición de plasmina aumenta. Por lo tanto, la inclusión de un aminoácido cargado o polar en la posición 17 se contempla específicamente en el presente documento.

[0086] El polipéptido de SEC ID N° 1 para referencia también puede comprender una o más mutaciones adicionales. Tal como se da a conocer en el presente documento, una mutación puede ser una adición, delección o sustitución de un aminoácido. Por ejemplo, además del cambio de leucina a arginina en la posición 17, la secuencia de aminoácidos puede comprender también el cambio de arginina a lisina en la posición 15, el cambio de alanina a metionina en la posición 16, o ambos. Los ejemplos de otros cambios en la posición 15 pueden encontrarse, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.595.674.

[0087] También se da a conocer en el presente documento un polipéptido que comprende la SEC ID N° 1, en la que tirosina se cambia a ácido glutámico en la posición 46. En otra realización, la tirosina puede cambiarse a treonina en la posición 11. En otra realización, el ácido aspártico puede cambiarse a tirosina o ácido glutámico en la posición 10. Estos polipéptidos también pueden comprender una o más mutaciones adicionales, tales como aquellas descritas anteriormente. Para resumir, los ejemplos de cambios de aminoácidos para la SEC ID N° 1 pueden encontrarse en la tabla 1. Estos son solamente ejemplos, y un experto en la materia entendería que cualquiera de estas mutaciones podía usarse en solitario o en combinación con las otras mutaciones enumeradas en el presente documento, o con otras no enumeradas, en cualquier permutación o combinación posible.

TABLA 1 – Mutaciones de la SEC ID N° 1
R15K
L17R
L17K
D10Y
D10E
Y11T
Y46E
A16G
A16M
A16S

[0088] También se dan a conocer composiciones y ácidos nucleicos que corresponden a los polipéptidos descritos en el presente documento. Una descripción de ácidos nucleicos, composiciones, y procedimientos de administración se da a continuación. También se dan a conocer ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos da a conocerlos en el presente documento. En el presente documento se dan a conocer polipéptidos y sus ácidos nucleicos correspondientes. Se entiende que una manera de definir cualesquiera variantes y derivados conocidos o aquellos que podrían surgir de los ácidos nucleicos y proteínas da a conocerlos en el presente documento es mediante la definición de las variantes y derivados en términos de homología con secuencias conocidas específicas. Por ejemplo la SEC ID N° 1 describe una secuencia particular de KD1 y SEC ID N° 2 describe una secuencia particular de KD1 que contiene una mutación. Un experto en la materia en el momento de la invención habría entendido que pueden producirse otras mutaciones tanto en el ácido nucleico como en la proteína de tipo silvestre. Algunas mutaciones de los mismos que no afectarían a su funcionalidad, mientras que otras pueden afectar a la funcionalidad de una manera positiva, y por lo tanto se seleccionan. Se dan a conocer específicamente variantes de estos y otros genes y proteínas da a conocerlos en el presente documento que tienen al menos, el 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento de homología con la secuencia indicada. Los expertos en la materia entienden fácilmente cómo determinar la homología de dos proteínas o ácidos nucleicos, tales como genes. Por ejemplo, la homología puede calcularse después de alinear las dos secuencias de modo que la homología esté en su nivel más alto.

- [0089]** Otra manera de calcular la homología puede realizarse mediante algoritmos publicados. El alineamiento óptimo de secuencias para compararlas puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección.
- 10 **[0090]** Los mismos tipos de homología pueden obtenerse para ácidos nucleicos por ejemplo mediante los algoritmos da a conocerlos en Zuker, M. *Science* 244: 48-52, 1989, Jaeger y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 86: 7706-7710, 1989, Jaeger y col. *Methods Enzymol.* 183: 281-306, 1989. Existen moléculas da a conocerlas en el presente documento que están basadas en ácidos nucleicos, incluyendo por ejemplo los ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, KD1 así como cualesquiera otras proteínas da a conocerlas en el presente documento, así como diversos ácidos nucleicos funcionales. Los ácidos nucleicos da a conocerlos se componen por ejemplo, de nucleótidos, análogos de nucleótidos, o sustitutos de nucleótidos. Los ejemplos no limitantes de éstas y otras moléculas se describen en el presente documento. Se entiende que, por ejemplo, cuando un vector se expresa en una célula, el ARNm expresado estará típicamente compuesto por A, C, G y U.
- 15 **[0091]** Un nucleótido es una molécula que contiene un resto de base, un resto de azúcar y un resto fosfato. Los núcleos pueden estar unidos conjuntamente a través de sus restos fosfato y restos de azúcar creando un enlace internucleosídico. El resto de base de un nucleótido puede ser adenin-9-ilo (A), citosin-1-ilo (C), guanin-9-ilo (G), uracil-1-ilo (U) y timin-1-ilo (T). El resto de azúcar de un nucleótido es una ribosa o una desoxirribosa. El resto fosfato de un nucleótido es fosfato pentavalente. Un ejemplo no limitante de un nucleótido sería 3'-AMP (3'-adenosín monofosfato) o 5'-GMP (5'-guanosín monofosfato).
- 20 **[0092]** Un análogo de nucleótido es un nucleótido que contiene algún tipo de modificación de los restos de base, azúcar o fosfato. Las modificaciones a nucleótidos son bien conocidas en la técnica e incluirían por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina y 2-aminoadenina, así como modificaciones en los restos azúcar o fosfato.
- 25 **[0093]** Los sustitutos de nucleótidos son moléculas que tienen propiedades funcionales similares a nucleótidos, pero que no contienen un resto fosfato, tal como ácido peptidonucleico (APN). Los sustitutos de nucleótidos son moléculas que reconocerán ácidos nucleicos a la manera de Watson-Crick o Hoogsteen, pero que están enlazados juntos a través de un resto diferente de un resto fosfato. Los sustitutos de nucleótidos son capaces de adaptarse a una estructura de tipo doble hélice cuando interactúan con el ácido nucleico diana apropiado. También es posible enlazar otros tipos de moléculas (conjugados) a nucleótidos o análogos de nucleótidos para mejorar, por ejemplo, la captación celular. Los conjugados pueden estar enlazados químicamente al nucleótido o análogos de nucleótidos. Dichos conjugados incluyen, aunque sin limitarse a, restos de lípidos tales como un resto de colesterol. (Letsinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 1989, 86, 6553-6556).
- 30 **[0094]** Una interacción de Watson-Crick es al menos una interacción con la cara de Watson-Crick de un nucleótido, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido. La cara de Watson-Crick de un nucleótido, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido incluye las posiciones C2, N1 y C6 de un nucleótido, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido a base de purina y las posiciones C2, N3, C4 de un nucleótido, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido a base de pirimidina.
- 35 **[0095]** Una interacción de Hoogsteen es la interacción que tiene lugar en la cara de Hoogsteen de un nucleótido o análogo de nucleótido, que está expuesto en el surco principal del ADN bicatenario. La cara de Hoogsteen incluye la posición N7 y grupos reactivos (NH₂ u O) en la posición C6 de nucleótidos purínico.
- 40 **[0096]** Existen diversas secuencias relacionadas con, por ejemplo, KD1 y mutaciones del mismo, así como cualquier otra proteína da a conocerda en el presente documento que se dan a conocer en el Genbank, y estas y otras secuencias se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad, así como para subsecuencias individuales contenidas en su interior.
- 45 **[0097]** En el presente documento se proporcionan diversas secuencias y éstas y otras pueden encontrarse en el Genbank, en www.pubmed.gov. Los expertos en la materia entienden cómo resolver discrepancias y diferencias de secuencias y ajustar las composiciones y procedimientos que relacionan una secuencia particular con
- 50

otras secuencias relacionadas. Pueden diseñarse cebadores y/o sondas para cualquier secuencia, dada la información da a conocerda en el presente documento y conocida en la técnica.

[0098] Se dan a conocer composiciones que incluyen cebadores y sondas, que son capaces de interactuar con los genes da a conocerdos en el presente documento. En algunas realizaciones, los cebadores se usan para soportar reacciones de amplificación de ADN. Típicamente, los cebadores serán capaces de extenderse de una manera específica de secuencia. La extensión de un cebador de manera específica de secuencia incluye cualesquiera procedimientos en los que la secuencia y/o composición de la molécula de ácido nucleico con la que el cebador hibrida o se asocia de otra manera, dirige o influye en la composición o secuencia del producto producido por la extensión del cebador. La extensión del cebador de manera específica de secuencia incluye por lo tanto, aunque sin limitarse a, PCR, secuencia de ADN, extensión de ADN, polimerización de ADN, transcripción de ARN o transcripción inversa. Se prefieren técnicas y condiciones que amplifican al cebador de manera específica de secuencia. En algunas realizaciones, los cebadores se usan para las reacciones de amplificación de ADN, tales como PCR o secuenciación directa. Se entiende que, en algunas realizaciones, los cebadores también pueden extenderse usando técnicas no enzimáticas, donde por ejemplo, los nucleótidos u oligonucleótidos usados para extender el cebador se modifican de modo que reaccionarán químicamente para extender el cebador de manera específica de secuencia. Típicamente, los cebadores da a conocerdos hibridan con el ácido nucleico o la región del ácido nucleico o hibridan con el complemento del ácido nucleico o el complemento de una región de ácido nucleico.

[0099] En el presente documento se dan a conocer procedimientos de tratamiento de un sujeto que comprenden administrar al sujeto que lo necesita un ácido nucleico. Por ejemplo, en el presente documento se dan a conocer procedimientos de administración de un ácido nucleico que codifica un mutante de KD1, tales como los da a conocerdos en el presente documento. Estos procedimientos incluyen la administración y captación de ADN exógeno en las células de un sujeto (es decir, transducción o transfección de genes). Los ácidos nucleicos da a conocerdos pueden estar en forma de ADN o ARN desnudo, o los ácidos nucleicos pueden estar en un vector para administrar los ácidos nucleicos a las células, con lo que el fragmento de ADN que codifica el anticuerpo está bajo la regulación transcripcional de un promotor, tal como entendería bien un experto en la materia. El vector puede ser una preparación disponible en el mercado, tal como un vector de adenovirus (Quantum Biotechnologies, Inc. (Laval, Quebec, Canadá). La administración del ácido nucleico o vector a células puede ser mediante diversos mecanismos. Como un ejemplo, la administración puede ser mediante un liposoma, usando preparaciones de liposomas disponibles en el mercado tales como LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como otros liposomas desarrollados según procedimientos convencionales en la técnica. Además, el ácido nucleico o vector da a conocerdo puede administrarse in vivo mediante electroporación, cuya tecnología está disponible de Genetronics, Inc. (San Diego, CA) así como por medio de una máquina SONOPORATION (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, AZ).

[0100] Como un ejemplo, la administración del vector puede ser mediante un sistema viral, tal como un vector retroviral que puede empaquetar un genoma retroviral recombinante (véase por ejemplo, Pastan y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85: 4486, 1988; Miller y col., Mol. Cell. Biol. 6: 2895, 1986). El retrovirus recombinante puede usarse a continuación para infectar y, de este modo, administrar a las células infectadas ácido nucleico que codifica un anticuerpo ampliamente neutralizante (o fragmento activo del mismo). El procedimiento exacto de introducción del ácido nucleico alterado en células de mamífero no está, por supuesto, limitado al uso de vectores retrovirales. Otras técnicas están ampliamente disponibles para este procedimiento, incluyendo el uso de vectores adenovirales (Mitani y col., Hum. Gene Ther. 5: 941-948, 1994), vectores virales adenoasociados (AAV) (Goodman y col., Blood 84: 1492-1500, 1994), vectores lentivirales (Naidini y col., Science 272: 263-267, 1996), vectores retrovirales pseudotipados (Agrawal y col., Exper. Hematol. 24: 738-747, 1996). También pueden usarse técnicas de transducción física, tales como administración de liposomas y mecanismos de endocitosis mediados por receptores y otros (véase, por ejemplo, Schwartzenberger y col., Blood 87: 472-478, 1996). Estas composiciones y procedimientos da a conocerdos pueden usarse junto con cualquiera de estos u otros procedimientos de transferencia de genes usados habitualmente.

[0101] Como un ejemplo, si el ácido nucleico que codifica un anticuerpo es administrado a las células de un sujeto en un vector de adenovirus, la dosificación para administración de adenovirus a seres humanos puede variar de aproximadamente 107 a 109 unidades formadoras de placas (pfu) por inyección pero puede ser de hasta 1012 pfu por inyección (Crystal, Hum. Gene Ther. 8: 985-1001, 1997; Alvarez y Curiel, Hum. Gene Ther. 8: 597-613, 1997). Un sujeto puede recibir una única inyección o, si son necesarias técnicas adicionales, pueden repetirse a intervalos de seis meses (u otros intervalos de tiempo apropiados, según lo determinado por el facultativo experto) durante un periodo indefinido y/o hasta que la eficacia del tratamiento se ha establecido.

[0102] La administración parenteral del ácido nucleico o vector, si se usa, se caracteriza generalmente por inyección. Pueden prepararse inyectables de formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección o como emulsiones. Una estrategia revisada más recientemente para administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación lenta o liberación sostenida, de modo que se mantenga una dosificación constante. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 3.610.795. Para descripción adicional de formulaciones adecuadas y diversas vías de administración de compuestos terapéuticos, véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19ª ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995.

10

[0103] Tal como se describe en el presente documento, existen numerosas variantes de la proteína KD1 que se conocen y se contemplan en el presente documento. Específicamente, se dan a conocer mutaciones de KD1 que son preferibles en vista del tipo silvestre, tales como la SEC ID N° 2. Además de las variantes de KD1 funcionales da a conocerdas en el presente documento, existen derivados de la proteína KD1 que también funcionan con los da a conocerdos en el presente documento, y se contemplan en el presente documento. Las variantes y derivados de proteínas son bien entendidas por los expertos en la materia y pueden implicar modificaciones de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos típicamente están en una o más de tres clases: variantes por sustitución, inserción o delección. Las inserciones incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Las inserciones habitualmente serán inserciones más pequeñas que las de fusiones de los extremos amino o carboxilo, por ejemplo, del orden de uno a cuatro residuos. Los derivados de proteínas de fusión inmunógenos, tales como los descritos en los ejemplos, se preparan fusionando un polipéptido suficientemente grande para otorgar inmunogenicidad a la secuencia diana mediante reticulación in vitro o mediante cultivo celular recombinante transformado con ADN que codifica la fusión. Las delecciones se caracterizan por la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia proteica. Típicamente, no más de aproximadamente de 2 a 6 residuos se delecionan en cualquier sitio dentro de la molécula proteica. Estas variantes habitualmente se preparan mediante mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína, produciendo de este modo ADN que codifica la variante, y seguidamente expresando el ADN en el cultivo de células recombinantes. Las técnicas para realizar mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tiene una secuencia conocida se conocen bien, por ejemplo mutagénesis por cebador M13 y mutagénesis por PCR. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos individuales, pero pueden producirse en una serie de diferentes ubicaciones al mismo tiempo; las inserciones serán habitualmente del orden de aproximadamente de 1 a 10 restos de aminoácidos; y las delecciones variarán aproximadamente de 1 a 30 residuos. Las delecciones o inserciones preferentemente se realizan en pares adyacentes, es decir una delección de 2 residuos o la inserción de 2 residuos. Pueden combinarse sustituciones, delecciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para llegar a una construcción final. Las mutaciones no deben colocar a la secuencia fuera del marco de lectura y preferentemente no crearán regiones complementarias que podrían producir estructura de ARNm secundario. Las variantes por sustitución son aquellas en las que al menos un residuo se ha eliminado y un residuo diferente se ha insertado en su lugar. Dichas sustituciones generalmente se realizan de acuerdo con la siguiente tabla y se denominan como sustituciones conservativas.

40

TABLA 2: Sustituciones de aminoácidos

Sustituciones conservativas ejemplares del residuo original, otras se conocen en la técnica.
Ala; ser
Arg; lys, gln
Asn; gln; his
Asp; glu
Cys; ser
Glu; asn, lys
Glu; asp
Gly; pro
His; asn; gln
Ile; leu; val
Leu; ile; val
Lys; arg; gln
Met; leu; ile
Phe; met; leu; tyr
Ser; thr
Thr; ser
Trp; tyr
Tyr; trp; phe
Val; ile; leu

5 **[0104]** Se realizan cambios sustanciales en la función o la identidad inmunológica seleccionando sustituciones que son menos conservativas que las de la tabla 2, es decir, seleccionando residuos que difieren de forma más significativa en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en la zona de la sustitución, por ejemplo como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades de la proteína serán aquellas en las que (a) un residuo hidrófilo, por ejemplo serilo o treonilo, sustituye a (o es sustituido por) un residuo hidrófobo, por ejemplo leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina sustituye a (o es sustituida por) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo, sustituye a (o es sustituido por) un residuo electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, sustituye a (o es sustituido por) uno que no tiene cadena lateral, por ejemplo, glicina, en este caso, (e) aumentando el número de sitios para sulfatación y/o glucosilación. Por ejemplo, la sustitución de un residuo de aminoácido por otro que es biológica y/o químicamente similar es conocida por los expertos en la materia como una sustitución conservativa. Por ejemplo, una sustitución conservativa sería sustituir un residuo hidrófobo por otro, o un residuo polar por otro. Las sustituciones incluyen combinaciones tales como, por ejemplo, Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. Dichas variaciones sustituidas de forma conservativa de cada secuencia da a conocerda de forma explícita están incluidas en los polipéptidos de mosaico proporcionados en el presente documento.

25 **[0105]** La mutagénesis por sustitución o por delección puede emplearse para insertar sitios para N-glucosilación (Asn-X-Thr/Ser) u O-glucosilación (Ser o Thr). Las delecciones de cisteína u otros residuos lábiles también pueden ser deseables. Las delecciones o sustituciones de potenciales sitios de proteólisis, por ejemplo Arg, se consiguen, por ejemplo, deleccionando uno de los residuos básicos o sustituyendo uno por residuos glutaminilo o histidilo.

30 **[0106]** Algunas derivaciones postraduccionales son el resultado de la acción de células huésped recombinantes sobre el polipéptido expresado. Residuos glutaminilo y asparaginilo son frecuentemente desamidados de forma postraducciona a los residuos glutamilo y asparilo correspondientes. Como alternativa, estos residuos se desamidán en condiciones levemente ácidas. Otras modificaciones postraduccionales incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, mutilación de los grupos o-amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco págs. 79-86 [1983]), acetilación de la amina N-terminal y, en algunos casos, amidación del carboxilo C-terminal.

[0107] Se entiende que una manera de definir las variantes y derivados de las proteínas da a conocerlas en el presente documento es mediante la definición de las variantes y derivados en términos de homología/identidad con respecto a secuencias conocidas específicas. Por ejemplo, la SEC ID N° 1 describe una secuencia particular de KD1, y la SEC ID N° 2 describe una secuencia particular de un mutante del mismo. Se dan a conocer específicamente variantes de éstas y otras proteínas da a conocerlas en el presente documento que tienen al menos el 70% o el 75% o el 80% o el 85% o el 90% o el 95% de homología con la secuencia indicada. Los expertos en la materia entienden fácilmente cómo determinar la homología de dos proteínas. Por ejemplo, la homología puede calcularse después de alinear las dos secuencias de modo que la homología esté en su nivel más alto. Otra manera de calcular la homología puede realizarse mediante algoritmos publicados. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

[0108] Los mismos tipos de homología pueden obtenerse para ácidos nucleicos mediante, por ejemplo, los algoritmos da a conocerlos en Zuker, M. Science 244: 48-52, 1989, Jaeger y col. Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 86: 7706-7710, 1989, Jaeger y col. Methods Enzymol. 183: 281-306, 1989.

[0109] Se entiende que la descripción de mutaciones conservativas y homología pueden combinarse conjuntamente en cualquier combinación, tal como realizaciones que tienen al menos el 70% de homología con respecto a una secuencia particular en la que las variantes son mutaciones conservativas.

[0110] Dado que esta memoria descriptiva describe diversas proteínas y secuencias de proteína, se entiende que los ácidos nucleicos que pueden codificar estas secuencias de proteína también se dan a conocer. Esto incluiría todas las secuencias degeneradas relacionadas con una secuencia de proteína específica, es decir todos los ácidos nucleicos que tienen una secuencia que codifica una secuencia de proteína particular, así como todos los ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleicos degenerados, que codifican las variantes y derivados de las secuencias de proteína da a conocerlas. Por lo tanto, aunque cada secuencia de ácido nucleico particular puede no estar escrita en el presente documento, se entiende que todas y cada secuencia son, de hecho, da a conocerlas y descritas en el presente documento a través de la secuencia de proteína da a conocerla. También se entiende que, aunque ninguna secuencia de aminoácidos indica qué secuencia de ADN particular codifica esa proteína dentro de un organismo, donde variantes particulares de una proteína da a conocerla están da a conocerlas en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico conocida que codifica esa proteína en la región particular de la que surge esa proteína también es conocida y se da a conocer y describe en el presente documento.

[0111] Se entiende que existen numerosos análogos de aminoácidos y peptídicos que pueden incorporarse en las composiciones da a conocerlas. Por ejemplo, existen numerosos D-aminoácidos o aminoácidos que tienen un sustituyente funcional diferente de los mostrados en la tabla 2. Los estereoisómeros opuestos de péptidos de origen natural se dan a conocer, así como los estereoisómeros de análogos peptídicos. Estos aminoácidos pueden incorporarse fácilmente en las cadenas polipeptídicas cargando moléculas de ARNt con el aminoácido de elección y manipulando construcciones genéticas que utilizan, por ejemplo, codones ámbar, para insertar el aminoácido análogo en una cadena peptídica de una manera específica del sitio. Véase, por ejemplo, (Thorson y col., Methods in Molec. Biol. 77: 43-73 (1991), Zoller, Current Opinion in Biotechnology, 3: 348-354 (1992); Ibbá, Biotechnology & Genetic Engineering Reviews 13: 197-216 (1995), Cahill y col., TIBS, 14(10): 400-403 (1989); Benner, TIB Tech, 12: 158-163 (1994); Ibbá y Hennecke, Bio/technology, 12: 678-682 (1994)

[0112] Pueden producirse moléculas que recuerdan a péptidos, pero que no están conectadas mediante un enlace peptídico natural. Por ejemplo, los enlaces para aminoácidos o análogos de aminoácidos pueden incluir CH₂NH--, --CH₂S-, --CH₂-CH₂--, --CH=CH-- (cis y trans), -COCH₂ -, -CH(OH)CH₂-, y -CHH₂SO- (Estos y otros pueden encontrarse en Spatola, A. F. in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (marzo de 1983), Vol. 1, Número 3, Peptide Backbone Modifications (revisión general); Morley, Trends Pharm Sci (1980) págs. 463-468; Hudson, D. y col., Int J Pept Prot Res 14: 177-185 (1979) (--CH₂NH-, CH₂CH₂--); Spatola y col. Life Sci 38: 1243-1249 (1986) (--CH H₂--S); Hann J. Chem. Soc Perkin Trans. I 307-314 (1982) (-CH-CH--, cis y trans); Almquist y col. J. Med. Chem. 23: 1392-1398 (1980) (-COCH₂--); Jennings-White y col. Tetrahedron Lett 23: 2533 (1982) (--COCH₂--); Szelke y col. Solicitud Europea, EP 45665 CA (1982): 97: 39405 (1982) (-CH(OH)CH₂--); Holladay y col. Tetrahedron. Lett 24: 4401-4404 (1983) (--C(OH)CH₂-); y Hruby Life Sci 31: 189-199 (1982) (--CH₂-S-). Un enlace

no peptídico particularmente preferido es --CH₂NH-. Se entiende que los análogos peptídicos pueden tener más de un átomo entre los átomos enlazados, tales como β-alanina, ácido γ-aminobutírico, y similares.

[0113] Los análogos de aminoácidos y análogos y análogos peptídicos a menudo tienen propiedades mejoradas o deseables, tales como, producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas mejoradas (semi-vida, absorción, potencia, eficacia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), antigenicidad reducida, y otros.

[0114] Pueden usarse D-aminoácidos para generar péptidos más estables, dado que los D aminoácidos no son reconocidos por peptidasas como tales. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso por un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse para generar péptidos más estables. Pueden usarse residuos de cisteína para ciclar o unir dos o más péptidos conjuntamente. Esto puede ser beneficioso para limitar péptidos a conformaciones particulares. (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992)).

[0115] Se dan a conocer procedimientos de preparación de un organismo transgénico que comprenden administrar los ácidos nucleicos, vectores y/o células da a conocerlos.

[0116] La presente invención se describe más particularmente en los siguientes ejemplos, que pretenden ser ilustrativos solamente, dado que numerosas modificaciones y variaciones en su interior serán evidentes para los expertos en la materia.

[0117] Aunque el presente proceso se ha descrito en referencia a detalles específicos de ciertas realizaciones del mismo, no se pretende que dichos detalles deban considerarse limitaciones sobre el alcance de la invención excepto en cuanto a la medida en que estén incluidos en las reivindicaciones adjuntas.

[0118] Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completas de cómo se preparan y evalúan los compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o procedimientos reivindicados en el presente documento, y se pretende que sean puramente ejemplares de la invención y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, la temperatura es en °C o es a temperatura ambiente, y la presión está en o cerca de la presión atmosférica.

D. EJEMPLOS

1. Ejemplo 1

[0119] Materiales y procedimientos: El sustrato cromógeno H-D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilida (S-2251) se adquirió de DiaPharma Group Inc. (West Chester, OH). La plasmina humana se adquirió de Enzyme research laboratories. La aprotinina bovina (BPTI) se usó de Zymogenetics. La cepa de Escherichia coli BL21(DE3)pLys y el vector de expresión pET28a eran productos de Novagen Inc. (Madison, WI). El kit de mutagénesis dirigida QuikChange® se obtuvo de Stratagene (La Jolla, CA).

[0120] Expresión y purificación de proteínas de tipo silvestre y mutantes. El primer dominio inhibidor de proteinasa de tipo Kunitz de TFPI-2 humano (KD1) se clonó en el vector pET28a que contenía una etiqueta de His. Los mutantes se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida. Las proteínas se sobreexpresaron como proteínas de fusión etiquetadas con His N-terminal en la cepa de E. coli BL21 (DE3) pLys S. usando el sistema promotor T7. Las proteínas sobreexpresadas se recuperaron como cuerpos de inclusión y las proteínas se plegaron y se purificaron para liberarlas de la etiqueta de His (27). Las concentraciones se determinaron mediante espectroscopía UV.

[0121] Ensayos de inhibición de plasmina. Se realizaron ensayos de inhibición de plasmina incubando plasmina con diversas concentraciones de preparaciones de inhibidor (BPTI, KD1 de tipo silvestre, mutantes de KD1 R24K, L26R o R24K/L26R) en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 que contenían NaCl 100 mM, 0,1 mg/ml de BSA, CaCl₂ 5 mM durante 1 h a 37°C en una placa de microvaloración de 96 pocillos. El sustrato cromógeno S-2251 se añadió a continuación, y la actividad del aminoácido residual se midió en un lector de microplacas cinético UVmax de Molecular Devices con diferentes valores extremos (0,5 y 1 h) y concentraciones de S2251 (0,5 y 1 mM). Los datos de inhibición de plasmina se analizaron de acuerdo con la expresión de unión cuadrática.

[0122] En experimentos de control, en primer lugar se estudió si había cualquier desplazamiento, inducido por el sustrato, de inhibidor unido aumentando las concentraciones de sustrato. Tanto BPTI (figura 2) como KD1 de tipo silvestre (figura 3) se ensayaron y los resultados muestran que, aparentemente, no hay ningún desplazamiento de inhibidor unido aumentando las concentraciones de sustrato. También se ensayó si un tiempo de incubación de inhibidor con plasmina aumentado daría o no como resultado una inhibición mejorada. Éste no era el caso (figura 2 y figura 3). Estos resultados validan los resultados presentados en la figura 4. Los resultados obtenidos a partir de los estudios de inhibición de plasmina muestran que el R15K/L17R mutante es un potente inhibidor de plasmina e inhibe la plasmina con muchas veces más fuerza que el KD 1 de tipo silvestre o el mutante R24K (figura 4). Se obtuvieron valores de K_i^* (constante inhibidora) de 22 nM para el tipo silvestre, 10 nM para R15K, 6 nM para L26R y 3 nM para el R15K/L17R. Por lo tanto el cambio de L17R es muy importante. El cambio de L17R se realizó en base a modelado molecular. El mutante R15K/L17R se une de forma mucho más fuerte a plasmina que el KD1 de tipo silvestre (7 veces) o el mutante R15K (~2 veces). Los mutantes L17R se unen a plasmina con aproximadamente 4 veces más fuerza que el KD1 de tipo silvestre. Por lo tanto, L26R o R15K/L17R pueden sustituir a BPTI en terapéutica clínica.

2. Ejemplo 2: Abolición de la actividad inhibidora de la coagulación intrínseca del dominio Kunitz 1 (KD1) de TFPI-2

[0123]

Información sobre nomenclatura
R24 (también conocido como R15) es P1
A25 (también conocido como A16) es P1'
L26 (también conocido como L17) es P2'

[0124] TFPI-2 inhibe la coagulación intrínseca presumiblemente mediante la inhibición del factor XIa (Petersen y col. *Biochemistry*. 9 de enero de 1996; 35(1): 266-272). Como todas las serina proteasas, el factor XIa escinde entre los residuos P1-P1' a TRAE o TRVV (P2-P1-P1'-P2'). Por lo tanto, KD1 de tipo silvestre que tiene Leu (residuo hidrófobo como Val) en la posición P2' debe inhibir el factor XIa. Por lo tanto el cambio de Leu a Arg en la posición P2' debe reducir/suprimir esta inhibición.

[0125]

Un procedimiento habitual para ensayar la inhibición de la coagulación es examinar el aPTT (tiempo de tromboplastina parcial activada) del plasma normal. En este ensayo, se mezcló activador superficial más fosfolípido con plasma normal a cantidades iguales (75 microlitros). Se añadieron diez microlitros de tampón que contenía inhibidor (KD1 de tipo silvestre, KD1 L26R o BPTI) y la muestra se incubó durante cinco minutos a 37°C. A continuación se añadieron setenta y cinco microlitros de CaCl_2 25 mM precalentado a 37°C y se anotó el tiempo necesario para formar el coágulo. Los datos se muestran en la figura 5. En el sistema de aPTT, la coagulación se inicia mediante la activación del factor XII a Factor XIIa mediante fase de contacto que implica el sistema de calicreína. El Factor XIIa activa a continuación el factor XI a factor XIa en la cascada de coagulación.

[0126]

El BPTI inhibe la calicreína mientras que KD1 de tipo silvestre inhibe tanto la calicreína como al factor XIa (Petersen y col 1996). Esto puede dar como resultado la prolongación del aPTT mediante BPTI y KD1 de tipo silvestre mientras que se espera que el mutante L26R de KD1 no inhiba ninguna, tal como se indica mediante ninguna inhibición (prolongación) de aPTT (figura 5). Esta observación hace del L26R KD1 un inhibidor específico de plasmina. Esto también aumenta su potencia inhibidora también hacia la plasmina. Por lo tanto, L26R KD1 no tiene ningún efecto sobre la coagulación y es un inhibidor más potente que el KD1 de tipo silvestre.

[0127]

La proteína mutante L26R pierde actividad como anticoagulante y se vuelve específica como agente antifibrinolítico. Por lo tanto, el mutante es más activo como agente antifibrinolítico pero además ya no es un anticoagulante. Esta propiedad le hace útil para prevenir hemorragias.

3. Ejemplo 3: Datos de inhibición de plasmina de ratón

[0128]

Tanto KD1 de tipo silvestre como L26R inhibían la plasmina de ratón de forma eficaz. Esto se muestra en la figura 6. Claramente el KD1 de tipo silvestre y el mutante L26R son bastante eficaces para inhibir la plasmina de ratón con un valor de Kd aparente de ~80 nM. La inhibición completa se obtuvo a 1 μM tanto para KD1 de tipo silvestre como L26R (Masci y col. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2000, Vol 11, Nº. 4, páginas 385-393). Dado que tanto el tipo silvestre como el mutante inhiben la plasmina de ratón, puede usarse el mutante para mostrar eficacia in vivo en un modelo animal de hemorragia.

[0129] Se ha descrito un modelo de hemorragia de la vena caudal de ratón para estudiar la eficacia de un inhibidor de plasmina de serpiente (Masci y col; *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2000, Vol 11, páginas 385-393). Usando este modelo de hemorragia de la vena caudal de ratón, comparado con control de solución salina, se observó una reducción del 67-70% de la pérdida de sangre donde la Aprotinina, KD1 de tipo silvestre o el mutante L26R se administró por vía intravenosa a aproximadamente 100 microgramos/ratón. Las dosis de los inhibidores de plasmina usadas en estos experimentos eran similares a la usada durante cirugía de CPB (derivación cardiopulmonar) humana, ajustadas al peso del ratón. El Comité de Ética Animal de UCLA aprobó todos los experimentos con ratones y la dosis usada en cirugía humana ajustada al peso del ratón era una base realista para estos estudios iniciales. Los niveles de BUN/Creatinina en suero eran normales después de dos días y siete días después de la administración del fármaco. El examen microscópico de tejidos no reveló ningún daño a órganos fundamentales tales como el riñón, el corazón y el cerebro. El KD1 de tipo silvestre y el KD1 L26R reducían la pérdida de sangre de forma casi tan eficaz como la Aprotinina. Sin embargo, esto se espera, dado que la dosis usada puede ser lo suficientemente alta para no observar diferencias entre los diferentes inhibidores (aprotinina, KD1 de tipo silvestre o el mutante L26R). Además, el KD1 L26R humano podía tener una mejor eficacia en seres humanos dado que inhibe la plasmina humana de forma más selectiva y no inhibe la coagulación.

REFERENCIAS

[0130]

- 20 1. Gans H, Castaneda AR, Subramanian V, John S, Lillehei CW. Problems in hemostasis during open heart surgery. IX. Changes observed in the plasminogen-plasmin system and their significance for therapy. *Ann Surg* 166: 980-986, 1967.
2. Shahian DM y Levine JD. Open-heart surgery in a patient with heterozygous alpha 2-antiplasmin deficiency. Perioperative strategies in the first reported case. *Chest* 97: 1488-1490, 1990.
- 25 3. Taggart DP, Diapardy V, Naik M y Davies A. A randomized trial of aprotinin (Trasylo) on blood loss, blood product requirement, and myocardial injury in total arterial grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126: 1087-94, 2003.
4. Sievert A, McCall M, Blackwell M y Bradley S. Effects of topical applications of aprotinin and tranexamic acid on blood loss after open heart surgery. *Anadolu Kardiyol Derg.* 5: 36-40, 2005
- 30 5. Kokoszka A, Kuflik P, Bitan F, Casden A, Neuwirth M. Evidence-based review of the role of aprotinin in blood conservation during orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Am* 87: 1129-36, 2005
6. Li J, Ny A, Leonardsson, G, Nandakumar KS, Holmdahl R y Ny T. The plasminogen activator/plasmin system is essential for development of the joint inflammatory phase of collagen type II-induced arthritis. *Am J Pathol* 166: 783-92, 2005.
- 35 7. Judex MO y Mueller BM. Plasminogen activation/plasmin in rheumatoid arthritis: matrix degradation and more. *Am J Pathol* 166: 645-647, 2005
8. Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* 1: 35-45, 2005
9. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P y Lajeunesse D., Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro. Possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum* 41: 891-899, 1998
- 40 10. Rondy HK, Smits HH, Quax PH, van der Pluijm G, Lowik CW, Breedveld FC y Verheijen JH. Bone matrix degradation by the plasminogen activation system. Possible mechanism of bone destruction in arthritis. *Br J Rheumatol* 36: 9-15, 1997.
11. Novak JF, Hayes JD, Nishimoto SK. Plasmin-mediated proteolysis of osteocalcin. *J Bone Miner Res* 12: 1035-1042, 1997.
- 45 12. Daci E, Udagava N, Martin TJ, Bouillon R y Carmeliet G. The role of the plasminogen system in bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res* 14: 946-52, 1999
13. Sakamaki H, Ogura N, Kujiraoka H, Akiba, M, Abikao Y y Nagura H. Activities of plasminogen activator, plasmin and kallikrein in synovial fluid from patients with temporomandibular joint disorders. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30: 323-328, 2001
- 50 14. Roy ME, Nishimoto SK. Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone* 31: 296-302, 2002.
15. Daci E, Everts V, Torrekens S, Van Herck E, Tigchelaar-Gutter W, Bouillon R y Carmeliet G. Increased bone formation in mice lacking plasminogen activators. *J Miner Res Bone* 18: 1167-76, 2003.
- 55 16. Choong PF y Nadesapillai. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop Relat Res* 415: S46-S58, 2003 (Supl)
17. Castellino FJ y Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost* 93: 647-54, 2005
18. Sprecher CA, Kisiel W, Mathewes S y Foster DC. Molecular cloning, expression, and partial characterization of a

- second human tissue factor pathway inhibitor. Proc Natl Acad Sci Estados Unidos 91: 3353-7, 1994
19. Miyagi Y, Koshikawa N, Yasumitsu H, Miyagi E, Hirahara F, Aoki I, Misugi K, Umeda M y Miyazaki K. cDNA cloning and mRNA expression of a serine proteinase inhibitor secreted by cancer cells: identification as placental protein 5 and tissue factor pathway inhibitor-2. J Biochem (Tokyo) 116:939-42, 1994
- 5 20. Rao CN, Peavey CL, Liu YY, Lapiere JC y Woodley DT. Partial characterization of matrix-associated serine protease inhibitors from human skin cells J Invest. Dermatol. 104, 379-383, 1995
21. Udagawa K, Miyagi Y, Hirahara F, Miyagi E, Nagashima, Y, Minaguchi H, Misugi K, Yasumitsu H y Miyazaki K. Specific expression of PP5/TFPI2 mRNA by syncytiotrophoblasts in human placenta as revealed by in situ hybridization Placenta 19, 217-223, 1998
- 10 22. Sugiyama T, Ishii S, Yamamoto J, Irie R, Saito K, Otuki T, Wakamatsu A, Suzuki Y, Hio Y, Ota T, Nishikawa T, Sugano S, Masuho Y, Isogai T. cDNA macroarray analysis of gene expression in synoviocytes stimulated with TNFalpha FEBS Lett. 517, 121-128, 2002
23. Iino M, Foster DC, Kisiel W. Quantification and characterization of human endothelial cell-derived tissue factor pathway inhibitor-2. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18, 40-46, 1998
- 15 24. Rao CN, Reddy P, Liu YY, O'Toole EAO, Reeder DJ, Foster DC, Kisiel W y Woodley, DT. Extracellular matrix-associated serine protease inhibitors (Mr 33,000, 31,000, and 27,000) are single-gene products with differential glycosylation: cDNA cloning of the 33-kDa inhibitor reveals its identity to tissue factor pathway inhibitor-2. Arch. Biochem. Biophys. 335, 45-52, 1996
25. Chand, H. S., Schmidt, A. E., Bajaj, S. P. y Kisiel, W. Structure-function analysis of the reactive site in the first Kunitz-type domain of human tissue factor pathway inhibitor-2. J Biol Chem 279: 17500-17507, 2004
- 20 26. Huber R, Kukla D, Bode W, Schwager P, Bartels K, Deisenhofer J, Steigemann W. Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.9 A resolution. J Mol Biol. 89: 73-101, 1974
27. Schmidt AE, Chand HS, Cascio D, Kisiel W, Bajaj SP. Crystal Structure of Kunitz Domain 1 (KD1) of Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 in Complex with Trypsin: Implications for KD1 Specificity of Inhibition. J Biol Chem. 280: 27832-27838, 2005
28. Wang, X., Lin, X., Loy, J. A., Tang, J. y Zhang, X. C. Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase Science 281, 1662-1665, 1998.
29. Bajaj, M. S., Birktoft, J. J., Steer, S. A. y Bajaj, S. P. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. Thromb. Haemost. 86, 959-972, 2001.
- 30 30. Beierlein W, Scheule AM, Dietrich W, Ziemer G. Forty years of clinical aprotinin use: a review of 124 hypersensitivity reactions. Ann Thorac Surg. 79: 741-748, 2005.

REALIZACIONES

35

[0131]

1. Un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 1 con una o más mutaciones de aminoácidos, en el que la primera mutación comprende una sustitución de leucina a arginina o lisina en la posición 17, utilizando el sistema de numeración BPTI.
- 40 2. El polipéptido, según el párrafo 1, en el que el polipéptido comprende una segunda mutación, en el que la segunda mutación comprende una sustitución de tirosina a ácido glutámico en la posición 46.
3. El polipéptido, según el párrafo 1, en el que el polipéptido comprende una segunda mutación, en el que la segunda mutación comprende una sustitución de tirosina a treonina en la posición 11.
- 45 4. El polipéptido, según el párrafo 1, en el que el polipéptido comprende una segunda mutación, en el que la segunda mutación comprende una sustitución de ácido aspártico a tirosina en la posición 10.
5. El polipéptido, según el párrafo 1, en el que el polipéptido comprende una segunda mutación, en el que la segunda mutación comprende una sustitución de ácido aspártico a ácido glutámico en la posición 10.
6. El polipéptido, según el párrafo 1, en el que el polipéptido comprende una segunda mutación, en el que la segunda mutación comprende una sustitución de alanina a metionina, glicina o serina en la posición 16.
- 50 7. El polipéptido, según el párrafo 1, en el que las mutaciones de aminoácidos comprenden una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en una sustitución de tirosina a ácido glutámico en la posición 46, una sustitución de tirosina a treonina en la posición 11, una sustitución de alanina a metionina, glicina o serina en la posición 16, y una sustitución de ácido aspártico a tirosina o ácido glutámico en la posición 10.
8. Una composición que comprende el polipéptido, según cualquiera de los párrafos 1-7.
9. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido, según cualquiera de los párrafos 1-7.
10. Un procedimiento de inhibición de al menos una actividad de plasmina que comprende poner en contacto la plasmina con una cantidad eficaz del polipéptido, según cualquiera de los párrafos 1-7.
11. Un procedimiento de tratamiento de un sujeto con necesidad de inhibición de una actividad de plasmina, que

- comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del polipéptido, según cualquiera de los párrafos 1-7.
12. El procedimiento, según el párrafo 11, en el que el sujeto tiene angiogénesis.
13. El procedimiento, según el párrafo 11, en el que el sujeto tiene tumorigénesis.
14. El procedimiento, según el párrafo 11, en el que el sujeto está sometido a remodelación ósea.
- 5 15. El procedimiento, según el párrafo 11, en el que el sujeto tiene hemofilia.
16. El procedimiento, según el párrafo 11, en el que el sujeto está sometido a cirugía ortopédica.
17. El procedimiento, según el párrafo 11, en el que el sujeto está sometido a un injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG).
18. El procedimiento, según el párrafo 11, en el que el sujeto tiene el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
- 10 (SIRS).
19. Un procedimiento de tratamiento de la artritis reumatoide en un sujeto con necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del polipéptido del párrafo 1.
20. Un procedimiento de identificación de un inhibidor de plasmina, que comprende:
modelar una estructura cristalina de plasmina con una variante de KD1;
- 15 determinar la interacción entre la plasmina y la variante de KD1;
en base a los resultados de la etapa b, determinar si la variante de KD1 es un inhibidor de plasmina.
21. Un procedimiento de inhibición de plasmina en un sujeto con necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del ácido nucleico del párrafo 9.
22. El polipéptido, según cualquiera de los párrafos 1-7, en el que el ligando está unido al polipéptido.
- 20 23. Un animal transgénico que comprende el ácido nucleico del párrafo 9.
24. El procedimiento, según cualquiera de los párrafos 11-21, en el que el polipéptido presenta una menor actividad contra la coagulación en comparación con el dominio Kunitz de tipo silvestre de TFPI-2.

LISTA DE SECUENCIAS

25

[0132]

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA Bajaj, Paul S.

30 <120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES RELACIONADAS CON EL DOMINIO KUNITZ I MUTANTE DE TFPI-2

<130> RCU061202PEP

35 <150> US60/754,731

<151> 29-12-2005

<160> 5

40 <170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 73

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..73

50 <223> /mol_type="proteína"/nota="Descripción de la secuencia artificial:/nota = Construcción sintética"/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 1

```

Asp Ala Ala Gln Glu Pro Thr Gly Asn Asn Ala Glu Ile Cys Leu Leu
 1      5      10
Pro Leu Asp Tyr Gly Pro Cys Arg Ala Leu Leu Leu Arg Tyr Tyr Tyr
      20      25
Asp Arg Tyr Thr Gln Ser Cys Arg Gln Phe Leu Tyr Gly Gly Cys Glu
      35      40      45
Gly Asn Ala Asn Asn Phe Tyr Thr Trp Glu Ala Cys Asp Asp Ala Cys
      50      55      60
Trp Arg Ile Glu Lys Val Pro Lys Val
65      70
    
```

<210> 2

<211> 73

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> FUENTE

10 <222> 1..73

<223> /mol_type="proteína"/nota="Descripción de la secuencia artificial:/nota = Construcción sintética"/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 2

15

```

Asp Ala Ala Gln Glu Pro Thr Gly Asn Asn Ala Glu Ile Cys Leu Leu
 1      5      10
Pro Leu Asp Tyr Gly Pro Cys Arg Ala Arg Leu Leu Arg Tyr Tyr Tyr
      20      25
Asp Arg Tyr Thr Gln Ser Cys Arg Gln Phe Leu Tyr Gly Gly Cys Glu
      35      40      45
Gly Asn Ala Asn Asn Phe Tyr Thr Trp Glu Ala Cys Asp Asp Ala Cys
      50      55      60
Trp Arg Ile Glu Lys Val Pro Lys Val
65      70
    
```

<210> 3

<211> 59

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> FUENTE

25 <222> 1..59

<223> /mol_type="proteína"/nota="Descripción de la secuencia artificial:/nota = Construcción sintética"/organismo="Secuencia Artificial"

30 <400> 3

```

Asn Ala Glu Ile Cys Leu Leu Pro Leu Asp Tyr Gly Pro Cys Arg Ala
 1      5      10
Arg Leu Leu Arg Tyr Tyr Tyr Asp Arg Tyr Thr Gln Ser Cys Arg Gln
      20      25
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 Glu
      50      55
    
```

<210> 4

<211> 73
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>

<221> FUENTE
 <222> 1..73

<223> /mol_type="proteína"/nota="Descripción de la secuencia artificial:/nota = Construcción sintética"/organismo="Secuencia Artificial"

10

<400> 4

```

Asp Ala Ala Gln Glu Pro Thr Gly Asn Asn Ala Glu Ile Cys Leu Leu
 1          5          10
Pro Leu Asp Tyr Gly Pro Cys Arg Met Arg Leu Leu Arg Tyr Tyr Tyr
          20          25
Asp Arg Tyr Thr Gln Ser Cys Arg Gln Phe Leu Tyr Gly Gly Cys Glu
          35          40          45
Gly Asn Ala Asn Asn Phe Tyr Thr Trp Glu Ala Cys Asp Asp Ala Cys
          50          55          60
Trp Arg Ile Glu Lys Val Pro Lys Val
65          70
    
```

15

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..58

<223> /mol_type="proteína"/nota="Descripción de la secuencia artificial:/nota = Construcción sintética"/organismo="Secuencia Artificial"

20

<400> 5

```

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
 1          5          10
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
    
```

25

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido KD1 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 92% de identidad con la SEC ID NO: 3, en la que, utilizando el sistema de numeración BPTI:
 - 5 (i) el aminoácido en el residuo 17 es un residuo de aminoácido cargado o polar; y
 - (ii) el polipéptido inhibe una actividad de plasmina y presenta una menor actividad contra la coagulación en comparación con un polipéptido KD1 de tipo silvestre.

2. Polipéptido KD1, según la reivindicación 1, en el que el aminoácido en el residuo 17 se selecciona del grupo que

10 consiste en arginina y lisina.

3. Polipéptido KD1, según la reivindicación 1, en el que
 - (i) el residuo 18 es una leucina;
 - (ii) el residuo 19 es una leucina;
 - 15 (iii) el residuo 31 es una arginina; y
 - (iv) el residuo 34 es una leucina.

4. Polipéptido KD1, según la reivindicación 1, que se selecciona entre:
 - 20 (i) el polipéptido KD1, según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 93% de identidad con la SEC ID NO: 3,
 - (ii) el polipéptido KD1, según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 94% de identidad con la SEC ID NO: 3,
 - (iii) el polipéptido KD1, según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 95% de identidad con la SEC ID NO: 3, y
 - 25 (iv) el polipéptido KD1, según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 96% de identidad con la SEC ID NO: 3.

5. Polipéptido KD1, según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 97% de identidad con la SEC ID NO: 3; o en el que la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 98% de identidad con la

30 SEC ID NO: 3; o en el que la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 99% de identidad con la SEC ID NO: 3.

6. Polipéptido KD1, según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos comprende la SEC ID NO: 3.

7. Polipéptido KD1, según la reivindicación 1, en el que:
 - 35 (i) el residuo 17 de la SEC ID NO: 3 es un residuo de arginina;
 - (ii) el polipéptido KD1, según la reivindicación 1, comprende además una sustitución de tirosina a treonina en la posición 11;
 - (iii) el residuo 18 de la SEC ID NO: 3 es un residuo de leucina;
 - (iv) el residuo 19 de la SEC ID NO: 3 es un residuo de leucina;
 - 40 (v) el residuo 31 es un residuo de arginina; y
 - (vi) el residuo 34 es un residuo de leucina.

8. Polipéptido KD1, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en combinación con un ligando de receptor específico de un tipo de célula unido al polipéptido.

45

9. Composición que comprende el polipéptido KD1, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

10. Ácido nucleico que codifica el polipéptido KD1, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

- 50 11. Animal transgénico no humano que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 10.

12. Composición para utilizar en el tratamiento de un sujeto con necesidad de inhibición de una actividad de plasmina que se selecciona entre (a) una composición que comprende una cantidad eficaz del ácido nucleico, según la reivindicación 10, y (b) una composición que comprende una cantidad eficaz del polipéptido, según cualquiera de

55 las reivindicaciones 1-7.

13. Composición para utilizar, según la reivindicación 12, en la que el sujeto presenta una afección seleccionada entre angiogénesis; tumorigénesis; hemofilia; artritis reumatoide; remodelación ósea; hemofilia o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS); está sometido a cirugía ortopédica o está sometido a un injerto de

derivación de la arteria coronaria (CABG).

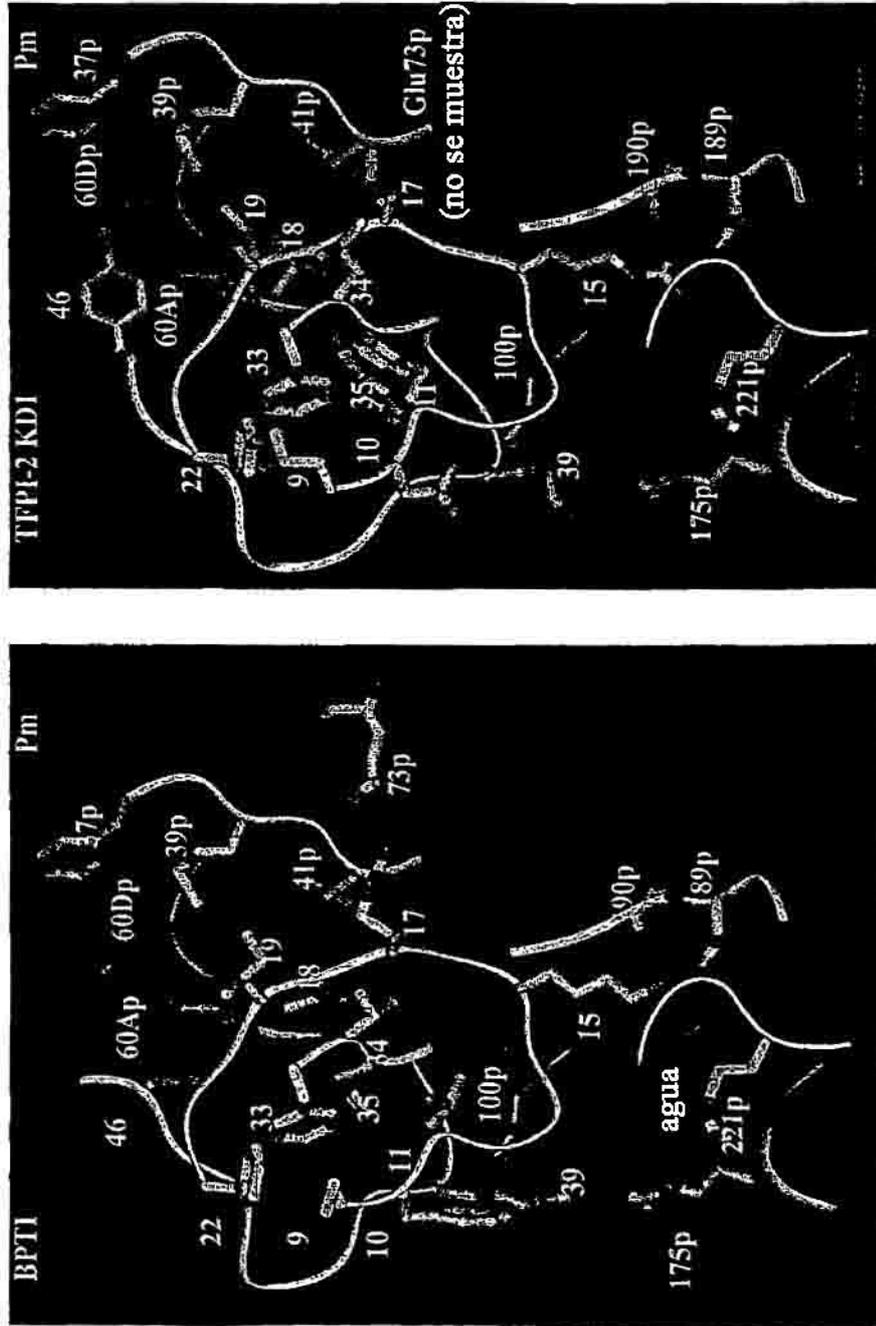
14. Composición, según la reivindicación 9, o composición para utilizar, según la reivindicación 12 ó 13, en las que el polipéptido presenta una menor actividad contra la coagulación en comparación con el dominio Kunitz de tipo 5 silvestre de TFPI-2.

15. Procedimiento de inhibición de al menos una actividad de plasmina que comprende poner en contacto la plasmina in vitro con una cantidad eficaz del polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7; en el que preferiblemente el inhibidor de plasmina presenta una menor actividad contra la coagulación en comparación con el 10 dominio Kunitz de tipo silvestre de TFPI-2.

FIGURA 1

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55

BPTI RPDFCLEPPYTGPKARI I RYFYNKAGL CQTFVYGGCRAKRNFKSAEDCMRTCGGA
 KD-1 NAE I CLLPLDYGPCRALLRYYDRYTQSCRQLYGGCEGNANNFYTWACDDACWRI



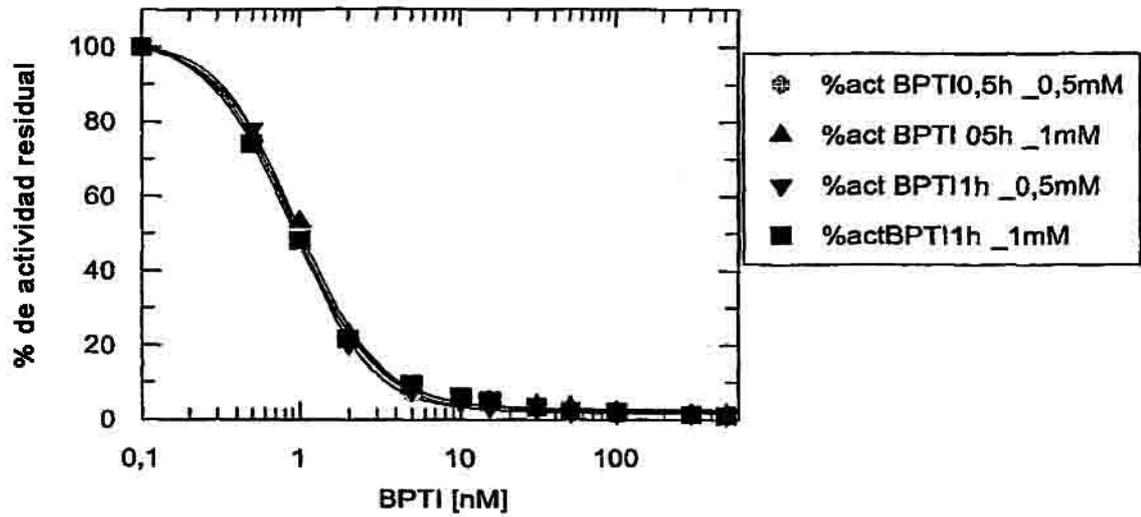


FIGURA 2

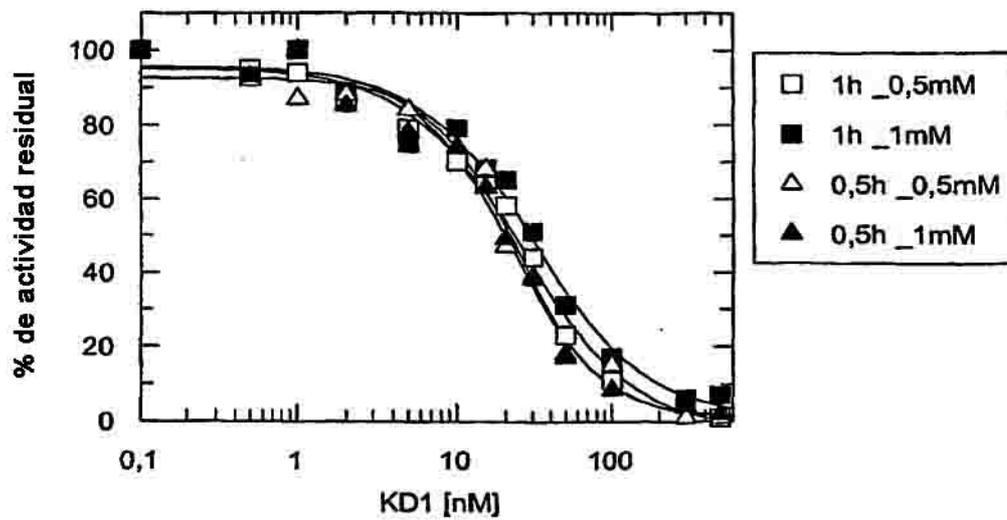


FIGURA 3

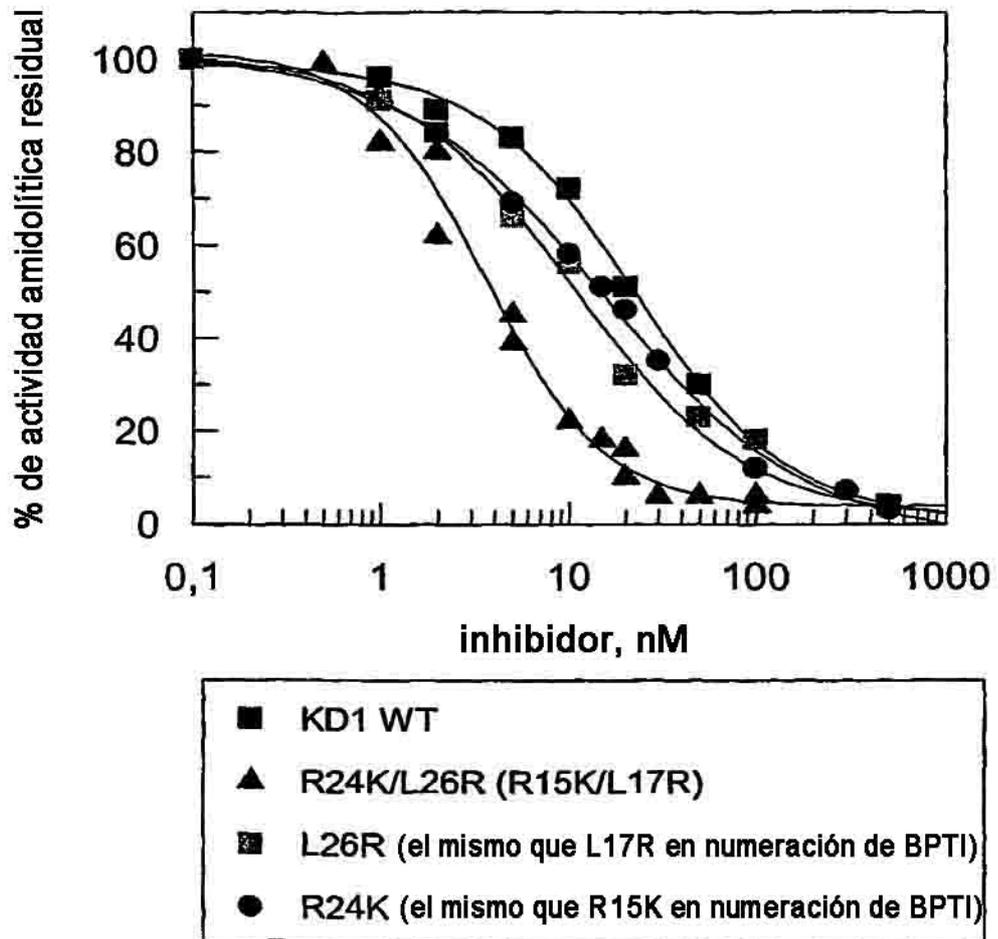


Fig. 4

FIGURA 5

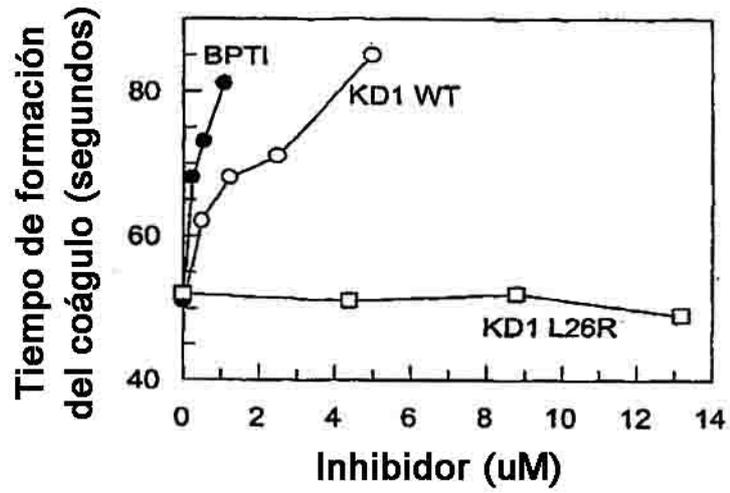


FIGURA 6

