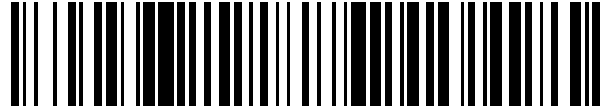


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 103**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2003 E 10191739 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2386310**

54 Título: **Métodos para conservar órganos y tejidos**

30 Prioridad:

28.08.2002 US 407004 P

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

15.04.2019

73 Titular/es:

**DYAX CORP. (100.0%)
300 Shire Way
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**CICARDI, MARCO y
BERGAMASCHINI, LUIGI**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 709 103 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

Métodos para conservar órganos y tejidos

5 **Solicitud relacionada**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 60/407.004, presentada el 28 de agosto de 2002.

10 **Antecedentes de la invención**

La conservación de la viabilidad de los órganos de donantes es un objetivo importante para el trasplante de órganos. Normalmente el órgano que va a trasplantarse debe almacenarse y enviarse al posible receptor. La capacidad de prolongar la viabilidad celular del órgano durante el almacenamiento y transporte es muy importante para tener éxito en la operación de trasplante. Las disoluciones de conservante desempeñan un papel importante en la longevidad del órgano. Las disoluciones para la conservación de órganos incluyen las descritas por Berdyaev *et al.*, patente estadounidense n.º 5.432.053; Belzer *et al.*, patentes estadounidenses n.º 4.798.824, 4.879.283 y 4.873.230; Taylor, patente estadounidense n.º 5.405.742; Dohi *et al.*, patente estadounidense n.º 5.565.317; Stem *et al.*, patentes estadounidenses n.º 5.370.989 y 5.552.267. Sin embargo, existe la necesidad de métodos y disoluciones mejorados para la conservación de órganos.

Las proteasas están implicadas en una amplia gama de rutas biológicas. En particular, serina proteasas tales como calicreína, plasmina, elastasa, activador de plasminógeno de urocinasa, trombina, inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteína humana y factores de coagulación tales como los factores VIIa, IXa, Xa, XIa y XIIa se han implicado en rutas que afectan al flujo sanguíneo, por ejemplo, isquemia general y focal, invasión tumoral, fibrinólisis, pérdida de sangre perioperatoria e inflamación. Los inhibidores de serina proteasas específicas, por tanto, han recibido atención como posibles dianas farmacológicas para diversas enfermedades isquémicas.

Un inhibidor de este tipo, la aprotinina (también denominado inhibidor de tripsina pancreática bovina o BPTI), obtenido del pulmón bovino, se ha aprobado en los Estados Unidos para uso profiláctico en la reducción de la pérdida de sangre periooperativa y la necesidad de transfusión en pacientes que se someten a CPB, por ejemplo, en el transcurso de un procedimiento de injerto de derivación de arterias coronarias. La aprotinina está disponible comercialmente con el nombre comercial TRASILOL® (Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut) y se aprobó previamente para su uso para tratar pancreatitis. La eficacia de la aprotinina está asociada con sus capacidades relativamente no específicas para inhibir una variedad de serina proteasas, incluyendo calicreína plasmática y plasmina. Estas proteasas son importantes en varias rutas del sistema de activación por contacto (CAS).

El CAS se activa inicialmente cuando la sangre completa entra en contacto con la superficie de sustratos foráneos (por ejemplo, caolín, vidrio, sulfato de dextrano o superficies óseas dañadas). La calicreína, una serina proteasa, es una enzima plasmática que inicia la cascada de CAS conduciendo a la activación de neutrófilos, plasmina, coagulación y diversas cininas. La calicreína se secreta como un zimógeno (precalicreína) que circula como molécula inactiva hasta que se activa por un acontecimiento proteolítico de manera temprana en la cascada de activación por contacto.

Sin embargo, el uso de inhibidores de calicreína específicos para la conservación de órganos no se había demostrado satisfactoriamente.

50 **Sumario de la invención**

Esta invención se basa en el descubrimiento de péptidos que inhiben serina proteasas, tales como, por ejemplo, calicreína, que pueden emplearse satisfactoriamente para conservar un órgano pendiente de trasplante. Más específicamente, la invención proporciona métodos de uso de inhibidores de calicreína en un método para conservar un órgano o tejido y composiciones para tal uso. La invención también se refiere a métodos para reducir, inhibir o prevenir el daño o la lesión por reperusión en un órgano o tejido que se ha extirpado de su huésped y a composiciones para tal uso. Los péptidos de calicreína preferidos incluyen los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 6.333.402 y 6.057.287 concedidas a Markland *et al.*

La presente memoria descriptiva describe composiciones que comprenden un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO: 1),

en la que Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 o Xaa58 son cada uno un aminoácido o están ausentes; Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 y Xaa54 pueden ser cualquier aminoácido; Xaa10 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asp y Glu; Xaa11 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala y Thr, Xaa13 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys y Gln; Xaa15 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn y Gln; Xaa16 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Gly, Ser, Asp y Asn; Xaa17 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln y Thr; Xaa18 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: His, Leu, Gln y Ala; Xaa19 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Pro, Gln, Leu, Asn e Ile; Xaa21 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Trp, Phe, Tyr, His e Ile; Xaa22 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe; Xaa23 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe; Xaa31 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile y Thr; Xaa32 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly y Val; Xaa34 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly y Leu; Xaa35 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr, Trp y Phe; Xaa39 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Gly, Ala, Ser y Asp; Xaa40 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Gly y Ala; Xaa43 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asn y Gly; Xaa45 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Phe y Tyr; y en la que dicho polipéptido inhibe calicreína, y métodos de uso de tales composiciones; la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto de referencia, posiciones de aminoácido específicas pueden ser las siguientes: Xaa6 puede ser Ala, Xaa7 puede ser Phe, Xaa8 puede ser Lys, Xaa9 puede ser Ala, Xaa10 puede ser Asp, Xaa11 puede ser Asp, Xaa13 puede ser Pro, Xaa15 puede ser Arg, Xaa16 puede ser Ala, Xaa17 puede ser Ala, Xaa18 puede ser His, Xaa19 puede ser Pro, Xaa20 puede ser Arg, Xaa24 puede ser Asn, Xaa25 puede ser Ile, Xaa26 puede ser Phe, Xaa27 puede ser Thr, Xaa28 puede ser Arg, Xaa29 puede ser Gln, Xaa31 puede ser Glu, Xaa32 puede ser Glu, Xaa34 puede ser Ile, Xaa35 puede ser Tyr, Xaa39 puede ser Glu, Xaa41 puede ser Asn, Xaa42 puede ser Arg, Xaa44 puede ser Arg, Xaa46 puede ser Glu, Xaa47 puede ser Ser, Xaa48 puede ser Leu, Xaa49 puede ser Glu y/o Xaa50 puede ser Glu; cualquiera de estos aminoácidos específicos en estas posiciones puede aparecer individualmente o en combinación con uno o más de los aminoácidos en una o más posiciones descritas de otra forma.

En un aspecto de referencia, la presente memoria descriptiva describe una composición que comprende un polipéptido tal como se describe en SEQ ID NO: 1, de manera que dos o más de las siguientes posiciones de aminoácido se definen tal como sigue: Xaa10 puede ser Asp; Xaa11 puede ser Asp; Xaa13 puede ser Pro; Xaa15 puede ser Arg; Xaa16 puede ser Ala; Xaa17 puede ser Ala; Xaa18 puede ser His; Xaa19 puede ser Pro; Xaa21 puede ser Trp; Xaa22 puede ser Phe; Xaa23 puede ser Phe; Xaa31 puede ser Glu; Xaa32 puede ser Glu; Xaa34 puede ser Ile; Xaa35 puede ser Tyr; Xaa39 puede ser Glu; Xaa40 puede ser Gly; Xaa43 puede ser Asn; y Xaa45 puede ser Phe, y métodos de uso de tales composiciones. En otro aspecto de referencia, cinco o más de las siguientes posiciones de aminoácido se definen tal como sigue: Xaa10 puede ser Asp; Xaa11 puede ser Asp; Xaa13 puede ser Pro; Xaa15 puede ser Arg; Xaa16 puede ser Ala; Xaa17 puede ser Ala; Xaa18 puede ser His; Xaa19 puede ser Pro; Xaa21 puede ser Trp; Xaa22 puede ser Phe; Xaa23 puede ser Phe; Xaa31 puede ser Glu; Xaa32 puede ser Glu; Xaa34 puede ser Ile; Xaa35 puede ser Tyr; Xaa39 puede ser Glu; Xaa40 puede ser Gly; Xaa43 puede ser Asn; y Xaa45 puede ser Phe. En un aspecto de referencia, 10 o más de los aminoácidos se definen tal como sigue: Xaa10 puede ser Asp; Xaa11 puede ser Asp; Xaa13 puede ser Pro; Xaa15 puede ser Arg; Xaa16 puede ser Ala; Xaa17 puede ser Ala; Xaa18 puede ser His; Xaa19 puede ser Pro; Xaa21 puede ser Trp; Xaa22 puede ser Phe; Xaa23 puede ser Phe; Xaa31 puede ser Glu; Xaa32 puede ser Glu; Xaa34 puede ser Ile; Xaa35 puede ser Tyr; Xaa39 puede ser Glu; Xaa40 puede ser Gly; Xaa43 puede ser Asn; y Xaa45 puede ser Phe. En aún otra realización, 15 o más de los aminoácidos se definen tal como sigue: Xaa10 puede ser Asp; Xaa11 puede ser Asp; Xaa13 puede ser Pro; Xaa15 puede ser Arg; Xaa16 puede ser Ala; Xaa17 puede ser Ala; Xaa18 puede ser His; Xaa19 puede ser Pro; Xaa21 puede ser Trp; Xaa22 puede ser Phe; Xaa23 puede ser Phe; Xaa31 puede ser Glu; Xaa32 puede ser Glu; Xaa34 puede ser Ile; Xaa35 puede ser Tyr; Xaa39 puede ser Glu; Xaa40 puede ser Gly; Xaa43 puede ser Asn; y Xaa45 puede ser Phe.

En un aspecto de referencia, la memoria descriptiva describe una composición que comprende un polipéptido tal como se define mediante SEQ ID NO: 1, de manera que, si está presente, Xaa3 es Ser, Xaa2 es His, Xaa1 es Met, Xaa56 es Thr, Xaa57 es Arg y/o Xaa58 es Asp, y métodos de uso de tales composiciones.

En otra realización, la invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos, con aa 3-60 de: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 2), y a métodos de uso de tales composiciones, en particular una composición que comprende un polipéptido de unión a calicreína de 53-60 aminoácidos que comprende un dominio Kunitz, en el que el dominio Kunitz comprende el potencial de enlaces disulfuro entre cisteínas en las posiciones 5 y 55; 14 y 38; y 30 y 51 (según posiciones de aminoácido correspondientes a inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI)), y que comprende además:

ES 2 709 103 T3

- número de aminoácido 13 seleccionado de His y Pro;
- número de aminoácido 16 seleccionado de Ala y Gly;
- 5 número de aminoácido 17 seleccionado de Ala, Asn y Ser;
- número de aminoácido 18 seleccionado de His y Leu; y
- 10 número de aminoácido 19 seleccionado de Gln, Leu y Pro (SEQ ID NO: 23).
- En una realización particular, la presente invención se dirige a una composición que comprende un polipéptido de unión a calicreína de 53-60 aminoácidos que comprende un dominio Kunitz, en el que el dominio Kunitz comprende el potencial de enlaces disulfuro entre cisteínas en las posiciones 5 y 55; 14 y 38; y 30 y 51 (según posiciones de aminoácido correspondientes a inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI)), y que comprende además:
- 15 número de aminoácido 13 seleccionado de His y Pro;
- número de aminoácido 15 seleccionado de Lys y Arg;
- 20 número de aminoácido 16 seleccionado de Ala y Gly;
- número de aminoácido 17 seleccionado de Ala, Asn y Ser;
- 25 número de aminoácido 18 seleccionado de His y Leu; y
- número de aminoácido 19 seleccionado de Gln, Leu y Pro,
- número de aminoácido 31 es Glu;
- 30 número de aminoácido 32 seleccionado de Glu y Gln;
- número de aminoácido 34 seleccionado de Ser, Thr e Ile; y
- 35 número de aminoácido 39 seleccionado de Gly, Glu y Ala (SEQ ID NO: 24).
- En una realización particular, la presente invención se dirige a una composición que comprende un polipéptido de unión a calicreína de 53-60 aminoácidos que comprende un dominio Kunitz, en el que el dominio Kunitz comprende una cisteína en cada una de las posiciones 5 y 55; 14 y 38; y 30 y 51 (según posiciones de aminoácido correspondientes a inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI)), y que comprende además:
- 40 número de aminoácido 13 seleccionado de His y Pro;
- número de aminoácido 15 seleccionado de Lys y Arg;
- 45 número de aminoácido 16 seleccionado de Ala y Gly;
- número de aminoácido 17 seleccionado de Ala, Asn y Ser;
- 50 número de aminoácido 18 seleccionado de His y Leu; y
- número de aminoácido 19 seleccionado de Gln, Leu y Pro,
- número de aminoácido 31 es Glu;
- 55 número de aminoácido 32 seleccionado de Glu y Gln;
- número de aminoácido 34 seleccionado de Ser, Thr e Ile; y
- 60 número de aminoácido 39 seleccionado de Gly, Glu y Ala (SEQ ID NO: 24).
- En una realización particular, el dominio Kunitz se selecciona del grupo que consiste en:
- KKII/3 n.º 1 (SEQ ID NO: 24)
- 65 KKII/3 n.º 2 (SEQ ID NO: 25)

KKII/3 n.º 3 (SEQ ID NO: 26)

KKII/3 n.º 4 (SEQ ID NO: 27)

5 KKII/3 n.º 5 (SEQ ID NO: 28)

KKII/3 n.º 6 (SEQ ID NO: 29)

10 KKII/3 n.º 7 (SEQ ID NO: 30)

KKII/3 n.º 8 (SEQ ID NO: 31)

KKII/3 n.º 9 (SEQ ID NO: 32) y

15 KKII/3 n.º 10 (SEQ ID NO: 33)

tal como se describe en la tabla 1.

20 Cada una de las composiciones descritas en el presente documento puede usarse en los métodos de la invención. Además, los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse en la fabricación de un medicamento o una composición para las indicaciones o los métodos descritos en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 es un diagrama simplificado de múltiples rutas importantes y acontecimientos relacionados implicados en el sistema de activación por contacto y la respuesta inflamatoria sistémica (SIR) que pueden surgir en un paciente que experimenta traumatismo de tejidos óseos y blandos tal como el asociado con un procedimiento de injerto de derivación de arterias coronarias (CABG), especialmente cuando el procedimiento de CABG implica circulación sanguínea extracorpórea, tal como derivación cardiopulmonar (CPB; aparato de derivación). Las flechas indican la activación de un componente o acontecimiento a otro componente o acontecimiento en la cascada. Las flechas en ambas direcciones indican efectos de activación de componentes o acontecimientos en ambas direcciones. Las flechas discontinuas indican la probable participación de un componente o acontecimiento en la activación de otro componente o acontecimiento. Las abreviaturas son las siguientes: "tPA" = activador de plasminógeno tisular; "C5a" = un componente proteico del sistema del complemento; "fXIIa" = proteína activadora de pre-caliceína para formar caliceína activa; "Extrínseco" = sistema de coagulación extrínseco; "Intrínseco" = sistema de coagulación intrínseco.

30 La figura 2 muestra una porción de un ADN y los aminoácidos deducidos correspondientes para un polipéptido inhibidor de caliceína ("KI") de la invención en el plásmido pPIC-K503. El ADN insertado codifica el péptido señal prepro mata de *Saccharomyces cerevisiae* (subrayado) fusionado en marco con el extremo amino-terminal del polipéptido PEP-1 de KI que tiene la secuencia de aminoácidos circundada por el área en el recuadro. La secuencia de aminoácidos del polipéptido PEP-1 de KI mostrada en la región en el recuadro es SEQ ID NO: 2, y la secuencia codificante de nucleótidos correspondiente del polipéptido de KI es SEQ ID NO: 3. Las flechas discontinuas indican la ubicación y dirección de dos secuencias de cebador de PCR en regiones AOX que se usaron para producir moldes de secuenciación. La secuencia de ADN para toda la secuencia de nucleótidos de la figura comprende la secuencia codificante estructural para la proteína de fusión y se designa SEQ ID NO: 35. La porción doblemente subrayada de la secuencia indica una secuencia de sonda de diagnóstico. *Bst*BI y *Eco*RI indican las ubicaciones de sus respectivos sitios de endonucleasas de restricción palindrómicos, hexaméricos en la secuencia. Los asteriscos indican codones de terminación de la traducción.

50 La figura 3 muestra una alineación de secuencias de aminoácidos de las realizaciones preferidas de la invención.

Descripción detallada de la invención

Lo siguiente es una descripción de realizaciones preferidas de la invención.

55 La invención se basa en el descubrimiento de polipéptidos de inhibidores de caliceína (KI) que inhiben caliceína plasmática con una especificidad que permite su uso en métodos mejorados de conservación de órganos y tejidos, tales como pendientes de un trasplante, y métodos correspondientes, tal como se define en las reivindicaciones. La invención también se refiere a la reducción, inhibición o prevención del daño o la lesión por reperfusión en un órgano o tejido que se ha extirpado de su huésped y a composiciones para lo mismo.

Polipéptidos útiles en la invención

65 Los polipéptidos de KI útiles en la invención comprenden polipéptidos de dominio Kunitz. En una realización estos dominios Kunitz son formas variantes que comprenden la estructura en bucle de dominio Kunitz 1 de la proteína de inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteína humana (LACI). LACI contiene tres estructuras de bucle

peptídicas internas bien definidas que son dominios Kunitz modelo (Girard, T. *et al.*, 1989. Nature, 338:518-520). Los tres dominios Kunitz de LACI confieren la capacidad de unirse a e inhibir calicreína, aunque no con una afinidad excepcional. Las variantes de dominio Kunitz 1 de LACI descritas en el presente documento se han examinado, aislado y se unen a calicreína con afinidad y especificidad potenciadas (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.795.865 y 6.057.287). El polipéptido útil en la invención tiene la secuencia de aminoácidos definida por los aminoácidos 3-60 de SEQ ID NO: 2.

Los polipéptidos de unión a calicreína pueden usarse para dirigir moléculas terapéuticas o de diagnóstico a calicreína en, por ejemplo, tejido de órganos, células u organismos completos. Tales métodos de administración dirigida para propósitos terapéuticos o de diagnóstico los conocería un experto en la técnica. Por ejemplo, un experto en la técnica podría usar polipéptidos de unión a calicreína dirigidos para identificar un órgano que se ha dañado por los efectos de la calicreína, o podría seleccionarse como diana calicreína para determinar los efectos de un agente terapéutico particular usando polipéptidos de unión a calicreína de la invención.

Cada polipéptido útil en la invención se une a calicreína. En realizaciones preferidas, los polipéptidos son inhibidores de calicreína (KI) tal como se determina usando ensayos de inhibición y unión a calicreína conocidos en la técnica. La afinidad y especificidad potenciadas por calicreína de los polipéptidos de dominio Kunitz variantes descritos en el presente documento proporcionan la base para su uso en procedimientos quirúrgicos de CPB y especialmente de CABG para prevenir o reducir la pérdida de sangre perioperatoria y/o SIR en pacientes que se someten a tales procedimientos. Los polipéptidos de KI usados en la invención pueden tener o comprender la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de dominio Kunitz variante aislado originalmente mediante el examen de colecciones de presentación en fago para determinar la capacidad de unirse a calicreína.

Los polipéptidos de KI descritos en el presente documento comprenden un polipéptido de dominio Kunitz que comprende la secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO: 1).

"Xaa" se refiere a una posición en una cadena peptídica que puede ser cualquiera de varios aminoácidos diferentes. Por ejemplo, para los péptidos de KI descritos en el presente documento, Xaa10 puede ser Asp o Glu; Xaa11 puede ser Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala o Thr; Xaa13 puede ser Pro, Arg, His, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys o Gln; Xaa15 puede ser Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn o Gln; Xaa16 puede ser Ala, Gly, Ser, Asp o Asn; Xaa17 puede ser Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln o Thr; Xaa18 puede ser His, Leu, Gln o Ala; Xaa19 puede ser Pro, Gln, Leu, Asn o Ile; Xaa21 puede ser Trp, Phe, Tyr, His o Ile; Xaa31 puede ser Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile o Thr; Xaa32 puede ser Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly o Val; Xaa34 puede ser Ile, Thr, Ser, Val, Ala, Asn, Gly o Leu; Xaa35 puede ser Tyr, Trp o Phe; Xaa39 puede ser Glu, Gly, Ala, Ser o Asp. Los aminoácidos Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 y Xaa54 pueden ser cualquier aminoácido. Adicionalmente, cada uno de los primeros cuatro y los últimos tres aminoácidos de SEQ ID NO: 1 pueden estar opcionalmente presentes o ausentes y pueden ser cualquier aminoácido, si están presentes.

Los péptidos definidos según SEQ ID NO: 1 forman un conjunto de polipéptidos que se unen a e inhiben calicreína. La diversidad de los KI aumenta a medida que aumenta el número de posiciones variables en la secuencia peptídica o a medida que aumenta el número de aminoácidos posibles en una posición variable. Por ejemplo, en un aspecto de la memoria descriptiva, un polipéptido de KI útil en los presentes métodos y composiciones tiene las siguientes posiciones variables: Xaa11 puede ser Asp, Gly, Ser o Val; Xaa13 puede ser Pro, Arg, His o Asn; Xaa15 puede ser Arg o Lys; Xaa16 puede ser Ala o Gly; Xaa17 puede ser Ala, Asn, Ser o Ile; Xaa18 puede ser His, Leu o Gln; Xaa19 puede ser Pro, Gln o Leu; Xaa21 puede ser Trp o Phe; Xaa31 es Glu; Xaa32 puede ser Glu o Gln; Xaa34 puede ser Ile, Thr o Ser; Xaa35 es Tyr; y Xaa39 puede ser Glu, Gly o Ala.

Un aspecto más específico de la memoria descriptiva se define mediante los siguientes aminoácidos en posiciones variables: Xaa10 es Asp; Xaa11 es Asp; Xaa13 puede ser Pro o Arg; Xaa15 es Arg; Xaa16 puede ser Ala o Gly; Xaa17 es Ala; Xaa18 es His; Xaa19 es Pro; Xaa21 es Trp; Xaa31 es Glu; Xaa32 es Glu; Xaa34 puede ser Ile o Ser; Xaa35 es Tyr; y Xaa39 es Gly.

Los polipéptidos de KI útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento comprenden un dominio Kunitz. Un subconjunto de las secuencias abarcadas por SEQ ID NO: 1 se describe mediante lo siguiente (cuando no se indica, "Xaa" se refiere al mismo conjunto de aminoácidos que se permiten para SEQ ID NO: 1):

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Arg Xaa21 Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 36).

ES 2 709 103 T3

Son ejemplos específicos y particulares de péptidos de KI descritos en el presente documento tal como sigue, en donde el primer péptido de KI mencionado es de la invención:

5 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr
Arg Asp (aminoácidos 3-60 de SEQ ID NO: 2),

10 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Asn His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 4),

15 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 5),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Gln Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 6),

20 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Ser Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 7),

25 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 8),

30 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 9),

35 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Lys Gly Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 10),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 11),

40 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 12),

45 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 13),

50 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala Gln Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 14),

55 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Leu Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 15),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Gly Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Gln Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 16),

60 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Gly Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 17),

65 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Arg Gly Ala Leu Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 18),

ES 2 709 103 T3

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Asn Cys Arg Gly Asn Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 19),

5 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Arg Cys Arg Gly Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 20),

10 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Ala Ile Gln Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 21),

15 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg
Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 22).

La figura 3 proporciona una alineación de secuencias de aminoácidos de estas secuencias.

20 Otros polipéptidos de KI útiles en la presente invención incluyen:

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly
Leu Cys Gln Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys
Gly Gly Ala (SEQ ID NO: 23),

25 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Ser Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 24),

30 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Asn His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 25),

35 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 26),

40 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Gln Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 27),

45 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Ser Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 28),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 29),

50 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 30),

55 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 31),

60 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met
Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 32),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys
Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 33),

65 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg

Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 34).

Estas secuencias se resumen en la siguiente tabla 1.

5 TABLA 1: Secuencias de aminoácidos de variantes de LACI(K1) seleccionadas por unirse a calicreína plasmática humana.

	13	16	17	18	19	31	32	34	39(a)
KKII/3 n.º 1 (SEQ ID NO: 24)	H	A	S	L	P	E	E	I	E
KKII/3 n.º 2 (SEQ ID NO: 25)	P	A	N	H	L	E	E	S	G
KKII/3 n.º 3 (SEQ ID NO: 26)	H	A	N	H	Q	E	E	T	G
KKII/3 n.º 4 (SEQ ID NO: 27)	H	A	N	H	Q	E	Q	T	A
KKII/3 n.º 5 (SEQ ID NO: 28)	H	A	S	L	P	E	E	I	G
KKII/3 n.º 6 (SEQ ID NO: 29)	H	A	N	H	Q	E	E	S	G
KKII/3 n.º 7 (SEQ ID NO: 30)	H	A	N	H	Q	E	E	S	G
KKII/3 n.º 8 (SEQ ID NO: 31)	H	A	N	H	Q	E	E	S	G
KKII/3 n.º 9 (SEQ ID NO: 32)	H	A	N	H	Q	E	E	S	G
KKII/3 n.º 10 (SEQ ID NO: 33)	H	G	A	H	L	E	E	I	E
Consenso	H	A	N	H	Q	E	E	S/T	G

10 (a) Número de aminoácidos de residuos variados. LACI(K1) (residuos de LACI 50-107 (SEQ ID NO: 32)) tiene 58 aminoácidos de longitud siendo la posición P1 el número de residuo 15 y estando fijado como lisina en este caso.

15 Los polipéptidos útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden prepararse de manera sintética usando cualquier equipo y protocolo de síntesis de péptidos convencional. Por ejemplo, la síntesis por etapas de un polipéptido de KI descrito en el presente documento puede llevarse a cabo mediante la eliminación de un grupo protector amino (N) terminal de un aminoácido inicial (es decir, carboxi-terminal), y el acoplamiento al mismo del extremo carboxilo del siguiente aminoácido en la secuencia del polipéptido. Este aminoácido está también adecuadamente protegido. El grupo carboxilo del aminoácido entrante puede activarse para que reaccione con el extremo N-terminal del aminoácido unido mediante la formación para dar un grupo reactivo tal como formación para dar una carbodiimida, un anhídrido de ácido simétrico o un grupo "éster activo" tal como hidroxibenzotriazol o ésteres pentafluorofenílicos. Los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida preferidos incluyen el método de BOC, que utiliza terc-butiloxicarbonilo como grupo protector de α -amino, y el método de FMOC, que utiliza 9-fluorenilmetiloxicarbonilo para proteger el α -amino de los residuos de aminoácido. Ambos métodos los conocen bien los expertos en la técnica (Stewart, J. y Young, J., Solid-Phase Peptide Synthesis (W. H. Freeman Co., San Francisco 1989); Merrifield, J., 1963. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154; Bodanszky, M. y Bodanszky, A., The Practice of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, Nueva York 1984). Si se desea, pueden diseñarse aminoácidos amino y/o carboxi-terminales para dar la secuencia de aminoácidos y añadirse durante la síntesis de polipéptidos.

30 Alternativamente, pueden producirse polipéptidos de dominio Kunitz y polipéptidos de KI útiles en las composiciones y los métodos de la invención mediante métodos recombinantes usando cualquiera de varias células y vectores de expresión correspondientes, incluyendo pero sin limitarse a vectores de expresión bacterianos, vectores de expresión de levaduras, vectores de expresión de baculovirus, vectores de expresión de virus de mamíferos, y similares. También pueden producirse polipéptidos de dominio Kunitz y polipéptidos de KI útiles en las composiciones y los métodos de la invención de manera transgénica usando moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia codificante de un polipéptido de dominio Kunitz o de KI descrito en el presente documento, en el que la molécula de ácido nucleico puede integrarse en y expresarse a partir del genoma de un animal huésped usando métodos transgénicos disponibles en la técnica. En algunos casos, puede ser necesario o ventajoso fusionar la secuencia codificante de un polipéptido de dominio Kunitz o un polipéptido de KI que comprende el dominio Kunitz con otra secuencia codificante en un vector de expresión para formar un polipéptido de fusión que se expresa fácilmente en una célula huésped. Preferiblemente, la célula huésped que expresa un polipéptido de fusión de este tipo también procesa el polipéptido de fusión para producir un polipéptido de dominio Kunitz o de KI útil en la invención que contiene sólo la secuencia de aminoácidos deseada. Obviamente, si cualquier otro aminoácido permanece unido al polipéptido de dominio Kunitz o de KI expresado, tal(es) aminoácido(s) adicional(es) no debe(n) disminuir la actividad de unión a calicreína y/o inhibidora de calicreína del polipéptido de dominio Kunitz o de KI de modo que impida el uso del polipéptido en los métodos o las composiciones de la invención.

Un sistema de expresión recombinante preferido para producir polipéptidos de KI útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento es un vector de expresión de levaduras, que permite que una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de KI o polipéptido de dominio Kunitz se una en el mismo marco de lectura con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de péptido líder prepro mata de *Saccharomyces cerevisiae*, que a su vez está bajo el control de un promotor de levadura operable. El plásmido de expresión de levaduras recombinante resultante puede transformarse entonces mediante métodos convencionales en las células de un huésped de levaduras apropiado, compatible, cuyas células son capaces de expresar la proteína recombinante a partir del vector de expresión de levaduras recombinante. Preferiblemente, una célula huésped de levadura transformada con un vector de expresión recombinante de este tipo también es capaz de procesar la proteína de fusión para proporcionar un polipéptido de KI útil en los métodos y composiciones de la invención. Un huésped de levadura preferido para producir polipéptidos de dominio Kunitz recombinantes y polipéptidos de KI que comprenden tales dominios Kunitz es *Pichia pastoris*.

Tal como se indicó anteriormente, los polipéptidos de KI que son útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden comprender un polipéptido de dominio Kunitz descrito en el presente documento. Algunos polipéptidos de KI pueden tener una secuencia flanqueante adicional, preferiblemente de uno a seis aminoácidos de longitud, en el extremo amino y/o carboxi-terminal, siempre que tales aminoácidos adicionales no disminuyan significativamente la afinidad de unión a calicreína o la actividad de inhibición de calicreína como para impedir su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Tales aminoácidos adicionales pueden añadirse deliberadamente para expresar un polipéptido de KI en una célula huésped recombinante particular o pueden añadirse para proporcionar una función adicional, por ejemplo, para proporcionar un péptido para unir el polipéptido de KI a otra molécula o para proporcionar un resto de afinidad que facilite la purificación del polipéptido. Preferiblemente, el/los aminoácido(s) adicional(es) no incluye(n) cisteína, que podría interferir con los enlaces disulfuro del dominio Kunitz. Los ejemplos nativos de dominios Kunitz presentan enlaces disulfuro, por ejemplo, BPTI contiene enlaces bisulfuro entre residuos de cisteína en las posiciones de aminoácido 5 y 55; 14 y 38; y 30 y 51.

El polipéptido de dominio Kunitz útil en los métodos y composiciones de la invención tiene la secuencia de aminoácidos de los residuos 3-60 de SEQ ID NO: 2. Cuando se expresa y se procesa en un sistema de expresión de proteínas de fusión de levaduras (por ejemplo, basado en el plásmido de expresión de integración pHIL-D2), un polipéptido de dominio Kunitz de este tipo conserva un dipéptido de Glu-Ala amino terminal adicional de la fusión con la secuencia de péptido líder prepro mata de *S. cerevisiae*. Cuando se secreta de la célula huésped de levadura, la mayor parte del péptido líder se procesa a partir de la proteína de fusión para producir un polipéptido funcional de KI (también denominado "PEP-1" o "DX88") que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (véase la región en el recuadro en la figura 2).

Los polipéptidos de KI particularmente preferidos útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento tienen una afinidad de unión por calicreína que es del orden de 1000 veces mayor que la de la aptinina, que está aprobada actualmente para su uso en procedimientos de CABG para reducir la pérdida de sangre. Las afinidades de unión sorprendentemente altas de tales polipéptidos de KI descritos en el presente documento indican que tales polipéptidos de KI presentan un alto grado de especificidad por calicreína para la exclusión de otras dianas moleculares (véase la tabla 1, a continuación). Por tanto, el uso de tales polipéptidos según la invención reduce mucha de la especulación acerca de las posibles dianas terapéuticas. El menor grado de especificidad presentado por, por ejemplo, la aptinina, conduce a posibles efectos secundarios pleiotrópicos y a ambigüedad acerca de su mecanismo terapéutico.

Los polipéptidos definidos por, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 contienen posiciones invariantes, por ejemplo, las posiciones 5, 14, 30, 51 y 55 pueden ser Cys sólo. Otras posiciones tales como, por ejemplo, las posiciones 6, 7, 8, 9, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53 y 54 pueden ser cualquier aminoácido (incluyendo aminoácidos que no se producen de manera natural). En una realización particularmente preferida, uno o más aminoácidos corresponden al de una secuencia nativa (por ejemplo, LACI (SEQ ID NO: 32-34)). En una realización preferida, al menos una posición variable es diferente de la de la secuencia nativa. En aún otra realización preferida, los aminoácidos pueden sustituirse cada uno individual o colectivamente mediante una sustitución de aminoácidos conservativa o no conservativa. Las sustituciones de aminoácidos conservativas reemplazan un aminoácido por otro aminoácido de estructura química similar y pueden no tener efecto sobre la función de la proteína. Las sustituciones de aminoácidos no conservativas reemplazan un aminoácido por otro aminoácido de estructura química distinta. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservados incluyen, por ejemplo, Asn->Asp, Arg->Lys y Ser->Thr. En una realización preferida, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y/o 21 de estos aminoácidos pueden seleccionarse independiente o colectivamente, en cualquier combinación, para que se correspondan con la posición correspondiente de SEQ ID NO: 2.

Otras posiciones, por ejemplo, las posiciones 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 y 45, pueden ser cualquiera de un conjunto seleccionado de aminoácidos. Por tanto SEQ ID NO: 1 define un conjunto de posibles secuencias. Cada miembro de este conjunto contiene, por ejemplo, una cisteína en las posiciones 5, 14, 30, 51 y 55, y uno cualquiera de un conjunto específico de aminoácidos en las posiciones 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 y 45. En una realización preferida, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15,16, 17, 18 y/o 19 de estos aminoácidos pueden seleccionarse independiente o colectivamente, en cualquier combinación, para que se correspondan con la posición correspondiente de SEQ ID NO: 2. El péptido tiene preferiblemente al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad con SEQ ID NO: 2.

5

Métodos y composiciones

La presente invención se dirige a métodos para conservar órganos y tejidos que comprenden poner en contacto el órgano o tejido con una disolución de conservante que comprende un inhibidor de calicreína, tal como se describe en las reivindicaciones. La invención también se refiere a reducir, inhibir o prevenir el daño o la lesión por reperfusión en un órgano o tejido que se ha extirpado de su huésped que comprende poner en contacto el órgano o tejido con dicho inhibidor de calicreína. Las disoluciones de conservante de la invención pueden usarse para conservar y/o proteger tejido de órganos, u órganos completos, cuando dichos órganos o tejido se ponen en contacto con la disolución. Una realización específica de la invención es para la conservación de un corazón humano, o tejido miocárdico humano. Otra realización de la invención es para la conservación de un pulmón humano o tejido pulmonar humano. Otros órganos, o partes de los mismos, que pueden conservarse según la invención incluyen riñón, hígado, tejido endotelial, tejido intestinal, tejido vascular (por ejemplo, un injerto de aorta), piel y páncreas. La invención contempla el uso de las disoluciones para conservar tejido de mamífero, órganos o una porción de los mismos. Además, las disoluciones pueden usarse para facilitar el trasplante de órganos, por ejemplo, mediante perfusión del órgano o tejido durante el procedimiento de trasplante. La disolución puede usarse también como disolución de cardioplejía en cirugía cardíaca. Preferiblemente, el órgano o porción del mismo se mantiene en la disolución apropiada en todo momento, particularmente, antes del procedimiento de trasplante.

Las disoluciones de la invención pueden usarse para mantener la viabilidad del órgano o tejido durante el almacenamiento, el trasplante u otra cirugía. La invención incluye un método de almacenamiento de tejido u órganos que comprende poner en contacto dicho tejido, órgano o parte del mismo, con la disolución de la invención, de manera que se prolongue la viabilidad *in vivo* y/o *in vitro*. Las disoluciones permiten el mantenimiento de la viabilidad del tejido de corazón o pulmón durante hasta 24 horas o más. El uso de las disoluciones de la invención da como resultado una viabilidad mejorada de los órganos.

Alternativamente o además, una vez extirpado del donante, el órgano o tejido vivo puede colocarse en una disolución de conservación que contiene el inhibidor. Además, el inhibidor de calicreína se administra también preferiblemente al receptor del trasplante justo antes de, o simultáneamente con, el trasplante. En todos los casos, el inhibidor también puede administrarse directamente al tejido en riesgo, como mediante inyección al tejido, o puede proporcionarse de manera sistémica, o bien mediante administración oral o bien parenteral, usando cualquiera de los métodos y formulaciones descritos en el presente documento y/o conocidos en la técnica.

En una realización, puede usarse cualquier disolución de conservación disponible comercialmente para sacar provecho. Los ejemplos de tales disoluciones incluyen la disolución de Belzer UW comercializada con la marca comercial VIASPAN, descrita en las patentes estadounidenses n.^{os} 4.798.824, 4.873.230, 4.879.283.

La disolución de conservación y la composición del perfundido descritas en las patentes mencionadas anteriormente incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente:

45 TABLA 2

Sustancia	Cantidad en 1 litro
Lactobionato de K ⁺	100 mmol
KH ₂ PO ₄	25 mmol
MgSO ₄	5 mmol
Rafinosa	30 mmol
Adenosina	5 mmol
Glutación	3 mmol
Insulina	100 U
Bactrim	0,5 ml
Dexametasona	8 mg
Alopurinol	1 mM

Hidroxietilalmidón que tiene un peso molecular de aproximadamente 200.000 a aproximadamente 300.000 daltons y un grado de sustitución de desde aproximadamente 0,4 hasta 0,7	50 g
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------

5 La disolución se lleva a pH 7,4 a temperatura ambiente con NaOH. Las concentraciones finales son Na=30,±0,5 mM, K⁺ = 120 ± 5 mM, mOsm/litro=320 ± 5. Bactrim = trimetoprima (16 mg/ml) y sulfametoxazol (80 mg/ml). El hidroxietilalmidón puede estar presente en el intervalo de desde aproximadamente el 3 hasta aproximadamente el 8 %.

10 Esta disolución proporciona normalmente una conservación de 72 horas del páncreas, una conservación de 48 horas del riñón y una conservación de al menos 24 horas del hígado. La patente estadounidense 5.145.771 describió la disolución de conservación de órganos conocida como "disolución Carolina", que es también útil en la presente invención. La disolución de conservación o enjuague descrita en la patente mencionada anteriormente incluye, pero no se limita a, los componentes en aproximadamente los intervalos de concentración expuestos en la tabla 3 a continuación.

15 TABLA 3

Intervalos de concentración en 1 litro Hidroxietilalmidón modificado al 10 % de 30 g/l a 100 g/l			
NaCl	85 mM	a	145 mM
KCl	3 mM	a	6 mM
CaCl ₂	1,0 mM	a	1,6 mM
KH ₂ PO ₄	0,7 mM	a	1,3 mM
MgSO ₄	0,9 mM	a	1,5 mM
Alopurinol	0,05 mM	a	5,0 mM
Desferrioxamina	0,02 mM	a	2,0 mM
Glutación	0,5 mM	a	10,0 mM
Nicardipino	0,1 μM	a	5,0 μM
Adenosina	0,1 mM	a	5,0 mM
Fructosa	1,0 mM	a	50,0 mM
Glucosa	1,0 mM	a	50,0 mM
Insulina	5 U/l	a	250 U/l
Mops	2 mM		40 mM

Una realización específica se prepara con los componentes en las cantidades expuestas en la tabla 4 a continuación según las instrucciones expuestas a continuación.

20 TABLA 4: Componentes de 1 litro de disolución de enjuague

500 ml	Agua desionizada destilada	
50 g/l	Hidroxietilalmidón modificado al 10 %	
115 mM	NaCl	6,7 g
5 mM	KCl	0,37 g
1,30 mM	CaCl ₂	0,19 g
1 mM	KH ₂ PO ₄	0,14 g
1,2 mM	MgSO ₄	0,15 g
1 mM	Alopurinol	0,14 g
1 mM	Desferrioxamina	0,65 g

ES 2 709 103 T3

3 mM	Glutación	0,92 g
2 μ M	Nicardipino	0,80 mg
1 mM	Adenosina	0,32 g
10 mM	Fructosa	1,8 g
10 mM	Glucosa	1,8 g
100 U/l	Insulina	100 unidades
20 mM	Mops	4,2 g

5 En una realización, esta disolución puede prepararse tal como sigue: usando un matraz volumétrico de 500 ml, medir 500 ml de disolución de hidroxietilalmidón al 10 % (peso/volumen) y verterla en un vaso de precipitados de 1 l. Añadir 400 ml de agua doblemente destilada y agitar vigorosamente usando una barra agitadora magnética. Añadir el resto de los componentes de uno en uno. Tras añadirse todos los componentes, ajustar el pH a 6,5 con 1-2 ml de NaOH 5 N. La disolución debe agitarse durante al menos treinta minutos. Transferir la disolución a un matraz volumétrico de 1 l y llevar hasta un volumen final de 1 l. Filtrar para eliminar cualquier partícula no disuelta.

10 Todavía otra realización se ejemplifica mediante la tabla 5 a continuación.

TABLA 5: Intervalos de concentración en 1 litro

NaCl	85 mM	a	145 mM
KCl	3 mM	a	6 mM
CaCl ₂	1,0 mM	a	1,6 mM
KH ₂ PO ₄	0,7 mM	a	1,3 mM
MgSO ₄	0,9 mM	a	1,5 mM
Adenosina	0,12 mM	a	1,2 mM

15 Una composición según la tabla 5 anterior puede incluir opcionalmente uno, varios o todos los componentes adicionales especificados en la tabla 3 anterior. Preferiblemente, la composición incluye al menos un antioxidante. Por tanto, una realización específica de una composición se expone en la tabla 6 a continuación:

TABLA 6: Componentes de 1 litro de disolución de enjuague

500 ml	Agua desionizada destilada	
115 mM	NaCl	6,7 g
5 mM	KCl	0,37 g
1,30 mM	CaCl ₂	0,19 g
1 mM	KH ₂ PO ₄	0,14 g
1,2 mM	MgSO ₄	0,15 g
1 mM	Alopurinol	0,14 g
1 mM	Desferrioxamina	0,65 g
3 mM	Glutación	0,92 g
0,12 mM	Adenosina	0,038 g

20 Las composiciones preferidas pueden comprender además uno o más tampones, portadores, antioxidantes, inhibidores de proteasa u otros agentes antiisquémicos farmacéuticamente aceptables.

25 Las composiciones útiles en los métodos de la invención comprenden polipéptidos de KI que comprenden un polipéptido de dominio Kunitz que tiene una secuencia de 58 aminoácidos de los aminoácidos 3-60 de SEQ ID NO: 2. Un ejemplo de un polipéptido de KI particularmente preferido de este tipo útil en los métodos y composiciones de la invención es el polipéptido PEP-1 de KI que tiene la secuencia de 60 aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En SEQ ID NO: 3 se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2

(véanse, por ejemplo, los nucleótidos 309-488 en la figura 2). Se entiende que, basándose en el código genético conocido, la invención también proporciona formas degeneradas de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 simplemente sustituyendo cada aminoácido codificado por la secuencia de nucleótidos por uno o más de los codones degenerados conocidos. Los nucleótidos 7-180 de SEQ ID NO: 3, y formas degeneradas de la misma, codifican el polipéptido de dominio Kunitz que no se produce de manera natural que tiene la secuencia de 58 aminoácidos de los aminoácidos 3-60 de SEQ ID NO: 2.

Consideraciones de concentración para polipéptidos de KI

10 Varias consideraciones con respecto a la dosificación con un polipéptido de KI en los métodos de la invención pueden ilustrarse a modo de ejemplo con el polipéptido PEP-1 de KI representativo de la invención que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (peso molecular de 7.054 Daltons).

15 La tabla 7, a continuación, proporciona una comparación de la afinidad ($K_{i,app}$) del polipéptido PEP-1 de KI por calicreína y otras once proteasas plasmáticas conocidas.

TABLA 7

Sustrato de proteasa	$K_{i,app}$ (pM) de PEP-1	$K_{i,app}$ (pM) de aprotinina
Calicreína plasmática humana	44	$3,0 \times 10^4$
Calicreína de orina humana	$>1 \times 10^8$	$4,0 \times 10^3$
Calicreína pancreática porcina	$2,7 \times 10^7$	550
C1r humano, activado	$>2,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$
C1s humano, activado	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
Factor XIa plasmático humano	$1,0 \times 10^4$	ND
Factor XIIa plasmático humano	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$
Plasmina humana	$1,4 \times 10^9$	894
Tripsina pancreática humana	$>2 \times 10^7$	ND
Quimotripsina pancreática humana	$>2,0 \times 10^7$	$7,3 \times 10^9$
Elastasa de neutrófilos humana	$>2,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^9$
Trombina plasmática humana	$>2,0 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$

ND = no determinado

20 Claramente, el polipéptido PEP-1 de KI es altamente específico para calicreína plasmática humana. Además, la afinidad ($K_{i,app}$) de PEP-1 por calicreína es 1000 veces mayor que la afinidad de aprotinina por calicreína: la $K_{i,app}$ de PEP-1 por calicreína es de aproximadamente 44 pM (tabla 1), mientras que la $K_{i,app}$ de aprotinina por calicreína es de 30.000 pM. Por tanto, una dosis de PEP-1 podría ser aproximadamente 1000 veces menor que la usada para aprotinina en una base molar. Sin embargo, la consideración de varios otros factores puede proporcionar una estimación más precisa de la dosis de PEP-1 requerida en la práctica. Tales factores incluyen la cantidad de calicreína activada tras la extirpación de un órgano de un paciente particular, y los reconocerá el experto en la técnica.

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

30 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Un polipéptido de KI representativo.

35 Se identificó un polipéptido de KI (PEP-1) útil en las composiciones y métodos de la invención como polipéptido de unión a calicreína presentado en un fago recombinante a partir de una colección de presentación en fago. PEP-1 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 2). El peso molecular de PEP-1 es de 7.054 Daltons.

La secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) del ADN de fago recombinante que codifica la secuencia de aminoácidos de PEP-1 (aminoácidos 3-60 de SEQ ID NO: 2) se aisló y se secuenció mediante métodos

convencionales determinados a partir del ADN de fago recombinante. Se produjo PEP-1 en cantidades útiles para su caracterización adicional como proteína recombinante en células huésped con fenotipo *His4⁻* de la cepa de levadura *Pichia pastoris*.

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

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

1. Se eliminó el sitio *Bst*BI en la región de AOX1 en 3' de pHIL-D2, ubicada en el sentido de 3' del gen *His4*, mediante digestión por restricción parcial, relleno y ligación, alterando la secuencia de TTCGAA (SEQ ID NO: 23) a TTCGCGAA (SEQ ID NO: 24). Se realizó esta modificación para facilitar y dirigir la clonación del casete de expresión
15 en el plásmido.

2. Se eliminó el sitio *Aat*II que lleva el gen *bla* ubicado en el sentido de 3' de *His4* mediante digestión por restricción, relleno y ligación modificando la secuencia de GACGTC (SEQ ID NO: 25) a GACGTACGTC (SEQ ID NO: 26). Se realizó esta modificación para facilitar la clonación de casetes de expresión que tienen sitios *Aat*II en el plásmido. Se sintetizó el ADN que codifica PEP-1 basándose en la secuencia de nucleótidos del fago de presentación que se une a calicreína original y consistía en 450 pares de bases (pb). La secuencia de ADN final del inserto en el plásmido
20 pHIL-D2 está flanqueada por una secuencia de AOX1 en 5' y una secuencia de AOX1 en 3' (porciones de las cuales se muestran en la figura 2) y codifican una proteína de fusión que comprende el péptido señal prepro mata de *S. cerevisiae* fusionado a la secuencia codificante estructural para el polipéptido PEP-1 de KI. Se añadió el péptido señal para facilitar la secreción de PEP-1 de las células huésped de levadura. Los oligonucleótidos para formar el inserto se sintetizaron y se obtuvieron comercialmente (Genesis Labs, The Woodlands, TX), y el inserto se generó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Entonces se incorporó el ADN sintético unido que codifica la proteína de fusión prepro mata/PEP-1 mediante ligación en el plásmido pHIL-D2 modificado entre los sitios *Bst*BI y *Eco*RI.
25
30

Se usaron los productos de ligación para transformar la cepa de *Escherichia coli* XL1 Blue. Se usó un ensayo de PCR para examinar transformantes de *E. coli* para detectar el constructo de plásmido deseado. Se amplificó ADN de extractos celulares mediante PCR usando cebadores que contenían las secuencias de AOX1 en 5' y AOX1 en 3' (véase anteriormente y la figura 2). Se secuenciaron los productos de PCR del número de pares de bases correcto.
35 Además, se secuenciaron aproximadamente 20-50 pb en cualquier lado de los sitios de clonación, y se obtuvo la secuencia predicha. La secuencia de ADN final del inserto en el plásmido pHIL-D2 (para producir el plásmido pPICK503) se muestra en la figura 2 junto con porciones de secuencias de AOX1 en 5' y 3' flanqueantes y secuencias de aminoácidos correspondientes de la proteína de fusión que comprenden el péptido señal prepro mata de *S. cerevisiae* fusionado a la secuencia codificante estructural para el polipéptido de PEP-1 de KI. Se seleccionó un transformante con el constructo de plásmido de expresión deseado, el plásmido pPICK503, para preparar líneas celulares de levadura para la producción rutinaria de PEP-1.
40

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

45 Se transformaron esferoplastos de *P. pastoris* GS115 que tenían el fenotipo *His4⁻* con el plásmido de expresión pPIC-K503 (anteriormente) tras la linearización del plásmido en el sitio *Sac*I y la recombinación homóloga del ADN de plásmido en el locus de AOX1 en 5'. El fenotipo de la cepa de producción es *His4⁻*. Se insertó todo el plásmido en la secuencia genómica de AOX1 en 5' de la levadura.

50 Se examinaron aislamientos de la transformación para detectar crecimiento en ausencia de histidina exógena con metanol como única fuente de carbono. Más del 95 % de los transformantes conservaban la capacidad de tipo natural para crecer con metanol como única fuente de carbono, demostrando de ese modo que el plásmido se había insertado en el genoma del huésped mediante recombinación homóloga en lugar de transposición. Estos transformantes no requerían histidina exógena para el crecimiento, demostrando de ese modo que el plásmido se había integrado en el genoma del huésped. Se clonaron colonias seleccionadas. Se realizaron estudios de expresión de cultivo pequeño para identificar clones que secretaban los mayores niveles de PEP-1 activo al medio de cultivo.
55 Se cuantificaron los niveles de secreción de PEP-1 en disoluciones de sobrenadante de cultivo clarificadas para determinar los niveles de PEP-1 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y se evaluaron para determinar la inhibición de calicreína. Se seleccionó un clon de levadura para la producción de PEP-1 basándose en su alto nivel de expresión de PEP-1 entre los cultivos muestreados.
60

Se prepararon comercialmente bancos de células maestras y de trabajo de *P. pastoris* que producen PEP-1 (MDS Pharma Services, Bothell, Washington). Una producción convencional de PEP-1 en levadura comprendía tres etapas tal como sigue: (1) preparación del cultivo simiente, (2) fermentación y (3) recuperación del cultivo.
65

La etapa de cultivo simiente consistía en la inoculación de seis frascos (300 ml cada uno) que contenían caldo de

inóculo (base de nitrógeno de levadura, fosfato de potasio y glicerol, pH = 5) con el contenido de un único vial de un banco de células de trabajo de *P. pastoris* que producen PEP-1. Se inocularon los frascos en un agitador orbital (300 rpm) durante aproximadamente 13 horas a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5 Se realizaron las fermentaciones en un fermentador Braun de 100 litros cerrado con caldo estéril. Se inició cada fermentación con la transferencia del contenido de los seis frascos de cultivo simiente al fermentador. Tras aproximadamente 24 horas, se agotó el glicerol en el fermentador y se añadió glicerol adicional durante aproximadamente 8 horas adicionales.

10 Entonces se inició una fase de alimentación mixta, que duró aproximadamente 83 horas, mediante la adición de una alimentación de glicerol y metanol. Al final de este tiempo, se terminó la fermentación, y se diluyó el contenido del fermentador con agua purificada. La purificación y el procesamiento de PEP-1 consistían en cinco etapas tal como sigue: (1) cromatografía en lecho expandido, (2) cromatografía de intercambio catiónico, (3) cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), (4) ultrafiltración y diafiltración y (5) filtración final y envasado.

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

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

25 Se agruparon fracciones seleccionadas en un recipiente limpio. Se concentró el conjunto mediante ultrafiltración. La preparación de PEP-1 concentrada se sometió a diafiltración inmediatamente frente a diez volúmenes de PBS, pH 7,0.

30 Se realizó una etapa de filtración final antes del envasado con el fin de minimizar la carga biológica en el PEP-1 en bruto. Se filtró la disolución en bruto a través de un filtro de 0,22 m y se recogió en una botella de PETG estéril, pesada previamente. Se retiró una muestra para las pruebas de liberación del lote. El resto del volumen se dispensó de manera aséptica en botellas de PETG estériles y se almacenó a -20°C .

35 Ejemplo 4: Ensayo de inhibición de calicreína.

Se usó una prueba cinética para medir la actividad inhibidora de polipéptidos de KI, tales como PEP-1. El ensayo cinético mide la fluorescencia tras la escisión mediada por calicreína de un sustrato, proliifencilalanilarginilaminometilcumarina. Se incubó una cantidad conocida de calicreína con un patrón de referencia de polipéptido de KI diluido en serie o muestras de prueba de polipéptido de KI diluidas en serie, en un tampón de reacción adecuado en una placa de microtitulación. Se ejecutó cada muestra por triplicado. Se añadió la disolución de sustrato, y se leyó la placa inmediatamente usando una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Se requería que al menos dos de cada una de las curvas de muestra y de patrón de referencia tuvieran un valor de R-cuadrado de 0,95 para que se considerase válida.

55 Ejemplo 5: Conservación de órganos

Se lavaron HUVEC en confluencia en PBS y se incubaron adicionalmente a 4 grados durante 24-48 horas en un medio libre de suero (SFM). Tras almacenamiento en frío, se lavaron las células varias veces con PBS, y se añadieron calicreína (0,125 U) y el sustrato de calicreína específico S2302 a las células. Se registraron los cambios en la densidad óptica. Para la evaluación por microscopía óptica de PEP-1 unido a células, tras almacenamiento en frío, se trataron HUVEC con PEP-1, se fijaron con formalina y se trataron con anticuerpo de conejo anti-PEP-1 y anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa. También se evaluó la capacidad de HUVEC para producir calicreína sobre la superficie celular y en los sobrenadantes de células mantenidas a 37°C . La actividad de calicreína era de 380 ± 19 U.A. en sobrenadantes de HUVEC mantenidos a 37°C ; no pudo medirse actividad en la superficie de las mismas células. En la evaluación por microscopía óptica había una unión significativa de PEP-1 a la

superficie de HUVEC tratadas en frío durante 24 horas. Se obtuvo el máximo de la unión incubando células en presencia de PEP-1 (5 mg/ml). PEP-1 unido a células conservaba la capacidad para inhibir calicreína exógena. Estos resultados indican que PEP-1 se une a células endoteliales, manteniendo su actividad inhibidora de calicreína. Por tanto, puede usarse para detectar y modular el daño mediado por cininas en la superficie vascular.

5 Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones preferidas de la misma, los expertos en la técnica entenderán que pueden hacerse diversos cambios en la forma y los detalles en la misma sin apartarse del alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones adjuntas.

10 A continuación se describen aspectos adicionales de esta divulgación y se denominan realizaciones E1 a E91; mediante lo cual debe indicarse que la presente invención se define mediante las reivindicaciones.

E1. Un método para conservar un órgano o tejido que comprende poner en contacto el órgano o tejido con una cantidad eficaz de un inhibidor de calicreína.

15 E2. El método de E1, en el que el polipéptido comprende un dominio Kunitz.

E3. El método según E2, en el que el inhibidor de calicreína es un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 2.

20 E4. El método según E2, en el que el inhibidor de calicreína es un polipéptido que comprende los aminoácidos 3-60 de SEQ ID NO: 2.

E5. El método de E1, en el que el órgano o tejido es corazón, pulmón, riñón, páncreas, hígado, intestino, tejido endotelial, tejido vascular o piel.

25 E6. Un método para conservar un órgano o tejido que comprende poner en contacto el órgano o tejido con una cantidad eficaz de un inhibidor de calicreína que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos: Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO: 1), en la que

Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 o Xaa58 son cada uno un aminoácido o están ausentes;

35 Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 y Xaa54 pueden ser cualquier aminoácido;

Xaa10 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asp y Glu;

40 Xaa11 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala y Thr;

Xaa13 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys y Gln;

Xaa15 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn y Gln;

45 Xaa16 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Gly, Ser, Asp y Asn;

Xaa17 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln y Thr;

50 Xaa18 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: His, Leu, Gln y Ala;

Xaa19 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Pro, Gln, Leu, Asn e Ile;

Xaa21 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Trp, Phe, Tyr, His e Ile;

55 Xaa22 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe;

Xaa23 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe;

60 Xaa31 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile y Thr;

Xaa32 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly y Val;

65 Xaa34 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly y Leu;

ES 2 709 103 T3

Xaa35 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr, Trp y Phe;

Xaa39 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Gly, Ala, Ser y Asp;

5 Xaa40 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Gly y Ala;

Xaa43 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asn y Gly;

10 Xaa45 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Phe y Tyr; y
en el que dicho polipéptido inhibe calicreína.

E7. El método de E6, en el que Xaa6 es Ala.

15 E8. El método de E6, en el que Xaa7 es Phe.

E9. El método de E6, en el que Xaa8 es Lys.

20 E10. El método de E6, en el que Xaa9 es Ala.

E11. El método de E6, en el que Xaa10 es Asp.

E12. El método de E6, en el que Xaa11 es Asp.

25 E13. El método de E6, en el que Xaa13 es Pro, Xaa15 es Arg, Xaa16 es Ala, Xaa17 es Ala, Xaa18 es His y Xaa19 es Pro.

E14. El método de E6, en el que Xaa20 es Arg.

30 E15. El método de E6, en el que Xaa24 es Asn.

E16. El método de E6, en el que Xaa25 es Ile.

35 E17. El método de E6, en el que Xaa26 es Phe.

E18. El método de E6, en el que Xaa27 es Thr.

E19. El método de E6, en el que Xaa28 es Arg.

40 E20. El método de E6, en el que Xaa29 es Gln.

E21. El método de E6, en el que Xaa31 es Glu.

45 E22. El método de E6, en el que Xaa32 es Glu.

E23. El método de E6, en el que Xaa34 es Ile.

E24. El método de E6, en el que Xaa35 es Tyr.

50 E25. El método de E6, en el que Xaa39 es Glu.

E26. El método de E6, en el que Xaa41 es Asn.

55 E27. El método de E6, en el que Xaa42 es Arg.

E28. El método de E6, en el que Xaa44 es Arg.

E29. El método de E6, en el que Xaa46 es Glu.

60 E30. El método de E6, en el que Xaa47 es Ser.

E31. El método de E6, en el que Xaa48 es Leu.

65 E32. El método de E6, en el que Xaa49 es Glu.

E33. El método de E6, en el que Xaa50 es Glu.

- 5 E34. El método de E6, en el que el polipéptido comprende dos o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: Asp en Xaa10; Asp en Xaa11; Pro en Xaa13; Arg en Xaa15; Ala en Xaa16; Ala en Xaa17; His en Xaa18; Pro en Xaa19; Trp en Xaa21; Phe en Xaa22; Phe en Xaa23; Glu en Xaa31; Glu en Xaa32; Ile en Xaa34; Tyr en Xaa35; Glu en Xaa39; Gly en Xaa40; Asn en Xaa43; y Phe en Xaa45.
- 10 E35. El método de E6, en el que el polipéptido comprende cinco o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: Asp en Xaa10; Asp en Xaa11; Pro en Xaa13; Arg en Xaa15; Ala en Xaa16; Ala en Xaa17; His en Xaa18; Pro en Xaa19; Trp en Xaa21; Phe en Xaa22; Phe en Xaa23; Glu en Xaa31; Glu en Xaa32; Ile en Xaa34; Tyr en Xaa35; Glu en Xaa39; Gly en Xaa40; Asn en Xaa43; y Phe en Xaa45.
- 15 E36. El método de E6, en el que el polipéptido comprende diez o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: Asp en Xaa10; Asp en Xaa11; Pro en Xaa13; Arg en Xaa15; Ala en Xaa16; Ala en Xaa17; His en Xaa18; Pro en Xaa19; Trp en Xaa21; Phe en Xaa22; Phe en Xaa23; Glu en Xaa31; Glu en Xaa32; Ile en Xaa34; Tyr en Xaa35; Glu en Xaa39; Gly en Xaa40; Asn en Xaa43; y Phe en Xaa45.
- 20 E37. El método de E6, en el que el polipéptido comprende quince o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: Asp en Xaa10; Asp en Xaa11; Pro en Xaa13; Arg en Xaa15; Ala en Xaa16; Ala en Xaa17; His en Xaa18; Pro en Xaa19; Trp en Xaa21; Phe en Xaa22; Phe en Xaa23; Glu en Xaa31; Glu en Xaa32; Ile en Xaa34; Tyr en Xaa35; Glu en Xaa39; Gly en Xaa40; Asn en Xaa43; y Phe en Xaa45.
- E38. El método de E6, en el que Xaa3 es Ser.
- 25 E39. El método de E6, en el que Xaa2 es His.
- E40. El método de E6, en el que Xaa1 es Met.
- E41. El método de E6, en el que Xaa56 es Thr.
- 30 E42. El método de E6, en el que Xaa57 es Arg.
- E43. El método de E6, en el que Xaa58 es Asp.
- 35 E44. El método según E6, en el que el inhibidor de calicreína es un polipéptido que comprende los aminoácidos 3-60 de SEQ ID NO: 2.
- E45. El método según E6, en el que el inhibidor de calicreína es un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 2.
- 40 E46. El método de E6, en el que el órgano o tejido es corazón, pulmón, riñón, páncreas, hígado, intestino, tejido endotelial, tejido vascular o piel.
- 45 E47. Un método para reducir la lesión por reperfusión de un órgano durante la cirugía y/o tras la extirpación del órgano de un sujeto, que comprende colocar el órgano en una disolución de conservación y almacenamiento de órganos, en el que la disolución comprende un inhibidor de calicreína.
- 50 E48. El método según E47, en el que el inhibidor de calicreína es un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 1, en la que Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 o Xaa58 son cada uno un aminoácido o están ausentes;
- Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 y Xaa54 pueden ser cualquier aminoácido;
- Xaa10 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asp y Glu;
- 55 Xaa11 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala y Thr;
- Xaa13 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys y Gln;
- Xaa15 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn y Gln;
- 60 Xaa16 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Gly, Ser, Asp y Asn;
- Xaa17 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln y Thr;
- 65 Xaa18 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: His, Leu, Gln y Ala;
- Xaa19 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Pro, Gln, Leu, Asn e Ile;

- Xaa21 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Trp, Phe, Tyr, His e Ile;
- 5 Xaa22 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe;
- Xaa23 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe;
- Xaa31 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile y Thr;
- 10 Xaa32 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly y Val;
- Xaa34 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly y Leu;
- 15 Xaa35 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr, Trp y Phe;
- Xaa39 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Gly, Ala, Ser y Asp;
- Xaa40 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Gly y Ala;
- 20 Xaa43 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asn y Gly;
- Xaa45 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Phe y Tyr.
- 25 E49. El método según E47, en el que el inhibidor de calicreína es un polipéptido que comprende los aminoácidos 3-60 de SEQ ID NO: 2.
- E50. El método según E47, en el que el inhibidor de calicreína es un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 2.
- 30 E51. El método de E47, en el que el órgano o tejido es corazón, pulmón, riñón, páncreas, hígado, intestino, tejido endotelial, tejido vascular o piel.
- E52. Una composición para conservar y/o almacenar un órgano que comprende una disolución de conservación de órganos *ex vivo* fisiológicamente aceptable que contiene un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos: Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO: 1), en la que
- 40 Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 o Xaa58 son cada uno individualmente un aminoácido o están ausentes;
- Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 y Xaa54 pueden ser cualquier aminoácido;
- 45 Xaa10 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asp y Glu;
- Xaa11 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala y Thr;
- Xaa13 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys y Gln;
- 50 Xaa15 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn y Gln;
- Xaa16 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Gly, Ser, Asp y Asn;
- 55 Xaa17 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln y Thr;
- Xaa18 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: His, Leu, Gln y Ala;
- Xaa19 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Pro, Gln, Leu, Asn e Ile;
- 60 Xaa21 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Trp, Phe, Tyr, His e Ile;
- Xaa22 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe;
- 65 Xaa23 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr y Phe;

ES 2 709 103 T3

Xaa31 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile y Thr;

Xaa32 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly y Val;

5

Xaa34 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly y Leu;

Xaa35 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Tyr, Trp y Phe;

10

Xaa39 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Glu, Gly, Ala, Ser y Asp;

Xaa40 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Gly y Ala;

Xaa43 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Asn y Gly;

15

Xaa45 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Phe y Tyr; y

en la que dicho polipéptido inhibe calicreína.

20

E53. La composición de E52, en la que Xaa6 es Ala.

E54. La composición de E52, en la que Xaa7 es Phe.

E55. La composición de E52, en la que Xaa8 es Lys.

25

E56. La composición de E52, en la que Xaa9 es Ala.

E57. La composición de E52, en la que Xaa10 es Asp.

30

E58. La composición de E52, en la que Xaa11 es Asp.

E59. La composición de E52, en la que Xaa13 es Pro, Xaa15 es Arg, Xaa16 es Ala, Xaa17 es Ala, Xaa18 es His y Xaa19 es Pro.

35

E60. La composición de E52, en la que Xaa20 es Arg.

E61. La composición de E52, en la que Xaa24 es Asn.

E62. La composición de E52, en la que Xaa25 es Ile.

40

E63. La composición de E52, en la que Xaa26 es Phe.

E64. La composición de E52, en la que Xaa27 es Thr.

45

E65. La composición de E52, en la que Xaa28 es Arg.

E66. La composición de E52, en la que Xaa29 es Gln.

E67. La composición de E52, en la que Xaa31 es Glu.

50

E68. La composición de E52, en la que Xaa32 es Glu.

E69. La composición de E52, en la que Xaa34 es Ile.

55

E70. La composición de E52, en la que Xaa35 es Tyr.

E71. La composición de E52, en la que Xaa39 es Glu.

E72. La composición de E52, en la que Xaa41 es Asn.

60

E73. La composición de E52, en la que Xaa42 es Arg.

E74. La composición de E52, en la que Xaa44 es Arg.

65

E75. La composición de E52, en la que Xaa46 es Glu.

ES 2 709 103 T3

- E76. La composición de E52, en la que Xaa47 es Ser.
- E77. La composición de E52, en la que Xaa48 es Leu.
- 5 E78. La composición de E52, en la que Xaa49 es Glu.
- E79. La composición de E52, en la que Xaa50 es Glu.
- 10 E80. La composición de E52, en la que el polipéptido comprende dos o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: Asp en Xaa10; Asp en Xaa11; Pro en Xaa13; Arg en Xaa15; Ala en Xaa16; Ala en Xaa17; His en Xaa18; Pro en Xaa19; Trp en Xaa21; Phe en Xaa22; Phe en Xaa23; Glu en Xaa31; Glu en Xaa32; Ile en Xaa34; Tyr en Xaa35; Glu en Xaa39; Gly en Xaa40; Asn en Xaa43; y Phe en Xaa45.
- 15 E81. La composición de E52, en la que el polipéptido comprende cinco o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: Asp en Xaa10; Asp en Xaa11; Pro en Xaa13; Arg en Xaa15; Ala en Xaa16; Ala en Xaa17; His en Xaa18; Pro en Xaa19; Trp en Xaa21; Phe en Xaa22; Phe en Xaa23; Glu en Xaa31; Glu en Xaa32; Ile en Xaa34; Tyr en Xaa35; Glu en Xaa39; Gly en Xaa40; Asn en Xaa43; y Phe en Xaa45.
- 20 E82. La composición de E52, en la que el polipéptido comprende diez o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: Asp en Xaa10; Asp en Xaa11; Pro en Xaa13; Arg en Xaa15; Ala en Xaa16; Ala en Xaa17; His en Xaa18; Pro en Xaa19; Trp en Xaa21; Phe en Xaa22; Phe en Xaa23; Glu en Xaa31; Glu en Xaa32; Ile en Xaa34; Tyr en Xaa35; Glu en Xaa39; Gly en Xaa40; Asn en Xaa43; y Phe en Xaa45.
- 25 E83. La composición de E52, en la que el polipéptido comprende quince o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: Asp en Xaa10; Asp en Xaa11; Pro en Xaa13; Arg en Xaa15; Ala en Xaa16; Ala en Xaa17; His en Xaa18; Pro en Xaa19; Trp en Xaa21; Phe en Xaa22; Phe en Xaa23; Glu en Xaa31; Glu en Xaa32; Ile en Xaa34; Tyr en Xaa35; Glu en Xaa39; Gly en Xaa40; Asn en Xaa43; y Phe en Xaa45.
- 30 E84. La composición de E52, en la que Xaa3 es Ser.
- E85. La composición de E52, en la que Xaa2 es His.
- E86. La composición de E52, en la que Xaa1 es Met.
- 35 E87. La composición de E52, en la que Xaa56 es Thr.
- E88. La composición de E52, en la que Xaa57 es Arg.
- E89. La composición de E52, en la que Xaa58 es Asp.
- 40 E90. La composición según E52, en la que el polipéptido comprende SEQ ID NO: 2.
- E91. Un método para conservar un órgano o tejido que comprende poner en contacto el órgano o tejido con una disolución de conservación de órganos *ex vivo* fisiológicamente aceptable que contiene un polipéptido de unión a calicreína.
- 45 E92. El método según E91, en el que el polipéptido de unión a calicreína comprende SEQ ID NO: 2.
- E93. El método de E91, en el que el órgano o tejido es corazón, pulmón, riñón, páncreas, hígado, intestino, tejido endotelial, tejido vascular o piel.
- 50 E94. El método de E91, en el que el polipéptido de unión a calicreína comprende un dominio Kunitz.
- E95. El método de E94, en el que el dominio Kunitz comprende una cisteína en cada una de posiciones 5 y 55; 14 y 55 38; y 30 y 51, y comprende además:
- número de aminoácido 13 seleccionado de His y Pro;
- número de aminoácido 16 seleccionado de Ala y Gly;
- 60 número de aminoácido 17 seleccionado de Ala, Asn y Ser;
- número de aminoácido 18 seleccionado de His y Leu; y
- 65 número de aminoácido 19 seleccionado de Gln, Leu y Pro (SEQ ID NO: 23),

en el que la numeración de aminoácidos se corresponde con las posiciones de aminoácido del dominio Kunitz de inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI).

5 E96. El método de E94, en el que el dominio Kunitz comprende una cisteína en cada una de las posiciones 5 y 55; 14 y 38; y 30 y 51, y comprende además:

número de aminoácido 13 seleccionado de His y Pro;

10 número de aminoácido 15 seleccionado de Lys y Arg;

número de aminoácido 16 seleccionado de Ala y Gly;

número de aminoácido 17 seleccionado de Ala, Asn y Ser;

15 número de aminoácido 18 seleccionado de His y Leu; y

número de aminoácido 19 seleccionado de Gln, Leu y Pro,

número de aminoácido 31 es Glu;

20 número de aminoácido 32 seleccionado de Glu y Gln;

número de aminoácido 34 seleccionado de Ser, Thr e Ile; y

25 número de aminoácido 39 seleccionado de Gly, Glu y Ala (SEQ ID NO: 24),

en el que la numeración de aminoácidos se corresponde con las posiciones de aminoácido del dominio Kunitz de inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI).

30 E97. Un método según E94, en el que el dominio Kunitz se selecciona del grupo que consiste en

KKII/3 n.º 1 (SEQ ID NO: 24)

35 KKII/3 n.º 2 (SEQ ID NO: 25)

KKII/3 n.º 3 (SEQ ID NO: 26)

KKII/3 n.º 4 (SEQ ID NO: 27)

40 KKII/3 n.º 5 (SEQ ID NO: 28)

KKII/3 n.º 6 (SEQ ID NO: 29)

45 KKII/3 n.º 7 (SEQ ID NO: 30)

KKII/3 n.º 8 (SEQ ID NO: 31)

KKII/3 n.º 9 (SEQ ID NO: 32) y

50 KKII/3 n.º 10 (SEQ ID NO: 33).

Listado de secuencias

55 <110> Dyax Corp.
Cicardi, Marco
Bergamaschini, Luigi

<120> Métodos para conservar órganos y tejidos

60 <130> 3421.1000003

<140> Documento PCT/US03/17802

<141> 06-06-2003

65 <150> Documento US 60/407.004

<151> 18-08-2002

ES 2 709 103 T3

- <160> 41
<170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- 5 <210> 1
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Proteína molde
- <221> VARIANTE
<222> 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 56, 57, 58
15 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
- <221> VARIANTE
<222> 10
<223> Xaa = Asp o Glu
- 20 <221> VARIANTE
<222> 11
<223> Xaa = Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala o Thr
- 25 <221> VARIANTE
<222> 13
<223> Xaa = Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys o Gln
- <221> VARIANTE
30 <222> 15
<223> Xaa = Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn o Gln
- <221> VARIANTE
<222> (16) ... (16)
35 <223> Xaa = Ala, Gly, Ser, Asp o Asn
- <221> VARIANTE
<222> (17) ... (17)
<223> Xaa = Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln o Thr
- 40 <221> VARIANTE
<222> (18) ... (18)
<223> Xaa = His, Leu, Gln o Ala
- 45 <221> VARIANTE
<222> (19) ... (19)
<223> Xaa = Pro, Gln, Leu, Asn o Ile
- <221> VARIANTE
50 <222> (21) ... (21)
<223> Xaa = Trp, Phe, Tyr, His o Ile
- <221> VARIANTE
<222> (22) ... (23)
55 <223> Xaa = Tyr o Phe
- <221> VARIANTE
<222> (31) ... (31)
<223> Xaa = Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile o Thr
- 60 <221> VARIANTE
<222> (32) ... (32)
<223> Xaa = Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly o Val
- 65 <221> VARIANTE
<222> (34) ... (34)

ES 2 709 103 T3

<223> Xaa = Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly o Leu

<221> VARIANTE

<222> (35) ... (35)

5 <223> Xaa = Tyr, Trp o Phe

<221> VARIANTE

<222> (39) ... (39)

10 <223> Xaa = Glu, Gly, Ala, Ser o Asp

<221> VARIANTE

<222> (40) ... (40)

<223> Xaa = Gly o Ala

15 <221> VARIANTE

<222> (43) ... (43)

<223> Xaa = Asn o Gly

<221> VARIANTE

20 <222> (45)...(45)

<223> Xaa = Phe o Tyr

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
20 25 30

Phe Xaa Xaa Gly Gly Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
50 55

25 <210> 2

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptido de unión aislado

<400> 2

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

Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

35 <210> 3

<211> 179

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Secuencia codificante de Pep-1

45 <400> 3

gaggctatgc actctttctg tgctttcaag gctgacgacg gtcgtgcaga gctgctcacc 60
caagatgggtt cttcaacatc ttcacgcgctc aatgcgagga gttcatctac ggtgggttg 120
agggtaacca aaacagattc gagtctctag aggagtgtaa gaagatgtgt actagagac 179

<210> 4

<211> 58

ES 2 709 103 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Péptido de unión aislado

<400> 4
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

10 <210> 5
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido de unión aislado

<400> 5
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

20 <210> 6
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión aislado

30 <400> 6
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Gln
 20 25 30
 Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

35 <210> 7
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión aislado

40 <400> 7

ES 2 709 103 T3

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

<210> 8
 <211> 58
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión aislado

10

<400> 8
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

<210> 9
 <211> 58
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Péptido de unión aislado

20

<400> 9
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly
 1 5 10 15
 Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

<210> 10
 <211> 58
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Péptido de unión aislado

30

<400> 10
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Lys Gly
 1 5 10 15
 Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

<210> 11
 <211> 58

35

ES 2 709 103 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido de unión aislado

<400> 11

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

10 <210> 12

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido de unión aislado

<400> 12

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

20

<210> 13

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido de unión aislado

<400> 13

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

30

<210> 14

<211> 58

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión aislado

40 <400> 14

ES 2 709 103 T3

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

<210> 15
 <211> 58
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión aislado

10 <400> 15
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Ser Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Leu Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

15 <210> 16
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Péptido de unión aislado

<400> 16
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Gly Gly Ser Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Gln Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

25 <210> 17
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido de unión aislado

<400> 17
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

35 <210> 18

<211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido de unión aislado

<400> 18
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala Leu Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30

Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45

10 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

<210> 19
 <211> 58
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión aislado

20 <400> 19
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Asn Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Asn Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

<210> 20
 <211> 58
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión aislado

30 <400> 20
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Arg Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

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

<220>
 40 <223> Péptido de unión aislado

<400> 21

ES 2 709 103 T3

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

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

<220>
 <223> Péptido de unión aislado

<400> 22
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

<210> 23
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión aislado

<400> 23
 Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
 20 25 30
 Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
 35 40 45
 Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
 50 55

<210> 24
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión aislado

<400> 24
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

<210> 25

ES 2 709 103 T3

<211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido de unión aislado

<400> 25
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

10 <210> 26
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido de unión aislado

<400> 26
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

20 <210> 27
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido de unión aislado

30 <400> 27
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Gln
 20 25 30
 Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

35 <210> 28
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido de unión aislado

<400> 28

ES 2 709 103 T3

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

<210> 29
 <211> 58
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión aislado

10

<400> 29
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

15 <210> 30
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido de unión aislado

<400> 30
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

25 <210> 31
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido de unión aislado

<400> 31
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

35

<210> 32
 <211> 58

ES 2 709 103 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Péptido de unión aislado

<400> 32
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

10 <210> 33
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido de unión aislado

<400> 33
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly
 1 5 10 15
 Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

20 <210> 34
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido de unión aislado

<400> 34
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

30 <210> 35
 <211> 548
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante para proteína de fusión

40 <221> CDS
 <222> (54) ... (488)

<400> 35

ES 2 709 103 T3

cgacttttaa cgacaacttg agaagatcaa aaaacaacta attattcgaa acg atg 56
Met
1

aga ttc cca tct atc_ttc act gct gtt ttg ttc gct gct tcc tct gct 104
Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala
5 10 15

ttg gct gct cca gtt aac acc act act gaa gac gag act gct caa att 152
Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln Ile
20 25 30

cct gct gag gct gtc atc ggt tac tct gac ttg gaa ggt gac ttc gac 200
Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe Asp
35 40 45

gtc gct gtt ttg cca ttc tct aac tct act aac aac ggt ttg ttg ttc 248
Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe
50 55 60 65

atc aac act acc atc gct tct atc gct gct aag gag gaa ggt gtt tcc 296
Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser
70 75 80

ctc gag aag aga gag gct atg cac tct ttc tgt gct ttc aag gct gac 344
Leu Glu Lys Arg Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp
85 90 95

gac ggt ccg tgc aga gct gct cac cca aga tgg ttc ttc aac atc ttc 392
Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe
100 105 110

acg cgt caa tgc gag gag ttc atc tac ggt ggt tgt gag ggt aac caa 440
Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln
115 120 125

aac aga ttc gag tct cta gag gag tgt aag aag atg tgt act aga gac 488
Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
130 135 140 145

tagtaagaat tcgccttaga catgactggt cctcagttca agttgggcac ttaacgagaag 548

<210> 36

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido de unión aislado

<221> VARIANTE

<222> 10

<223> Xaa = Asp o Glu

15 <221> VARIANTE

<222> 11

<223> Xaa = Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala o Thr

<221> VARIANTE

20 <222> 13

<223> Xaa = Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys o Gln

<221> VARIANTE

<222> 15

25 <223> Xaa = Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn o Gln

<221> VARIANTE
 <222> 16
 <223> Xaa = Ala, Gly, Ser, Asp o Asn

5 <221> VARIANTE
 <222> (17) ... (17)
 <223> Xaa = Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln o Thr

10 <221> VARIANTE
 <222> (18) ... (18)
 <223> Xaa = His, Leu, Gln o Ala

<221> VARIANTE
 <222> (19) ... (19)
 15 <223> Xaa = Pro, Gln, Leu, Asn o Ile

<221> VARIANTE
 <222> (21) ... (21)
 <223> Xaa = Trp, Phe, Tyr, His o Ile

20 <221> VARIANTE
 <222> (31) ... (31)
 <223> Xaa = Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile o Thr

25 <221> VARIANTE
 <222> (32) ... (32)
 <223> Xaa = Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly o Val

30 <221> VARIANTE
 <222> (34) ... (34)
 <223> Xaa = Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly o Leu

<221> VARIANTE
 <222> (35) ... (35)
 35 <223> Xaa = Tyr, Trp o Phe

<221> VARIANTE
 <222> (39) ... (39)
 <223> Xaa = Glu, Gly, Ala, Ser o Asp

40 <400> 36
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Xaa Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Xaa Xaa
 20 25 30
 Phe Xaa Xaa Gly Gly Cys Xaa Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

45 <210> 37
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sitio de clonación modificado

<400> 37
 ttcgaa

55 <210> 38
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sitio de clonación modificado

5 <400> 38
 ttcgcgaa 8

<210> 39
 <211> 6
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sitio de clonación modificado

15 <400> 39
 gacgtc 6

<210> 40
 <211> 10
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sitio de clonación modificado

25 <400> 40
 gacgtacgtc 10

30 <210> 41
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Proteína de fusión

<400> 41
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30

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

Asp
 145

40

REIVINDICACIONES

1. Composición para conservar y/o almacenar un órgano, comprendiendo la composición una disolución de conservación de órganos *ex vivo* fisiológicamente aceptable y un polipéptido de unión a calicreína de 53 - 60 aminoácidos, en la que el polipéptido de unión a calicreína comprende los aminoácidos 3-60 de SEQ ID NO: 2.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la disolución de conservación de órganos *ex vivo* comprende en 1 litro de la disolución:
 - (i) 100 mmol de lactobionato de K⁺, 25 mmol de KH₂PO₄, 5 mmol de MgSO₄, 30 mmol de rafinosa, 5 mmol de adenosina, 3 mmol de glutatión, 100 U de insulina, 0,5 ml de Bactrim (16 mg/ml), 8 mg de dexametasona, alopurinol 1 mM, y 50 g de hidroxietilalmidón que tiene un peso molecular de aproximadamente 200.000 a aproximadamente 300.000 y un grado de sustitución de desde aproximadamente 0,4 hasta 0,7;
 - (ii) hidroxietilalmidón modificado al 10% 30-100 g/l, NaCl 85-145 mM, KCl 3-6 mM, CaCl₂ 1,0-1,6 mM, KH₂PO₄ 0,7-1,3 mM, MgSO₄ 0,9-1,5 mM, alopurinol 0,05-5,0 mM, desferrioxamina 0,02-2,0 mM, glutatión 0,5-10,0 mM, nicardipino 0,1-5,0 μM, adenosina 0,1-5,0 mM, fructosa 1,0-50,0 mM, glucosa 1,0-50,0 mM, insulina 5-250 U/l y Mops 2-40 mM;
 - (iii) hidroxietilalmidón modificado al 10% 50 g/l, NaCl 115 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,30 mM, KH₂PO₄ 1 mM, MgSO₄ 1,2 mM, alopurinol 1 mM, desferrioxamina 1 mM, glutatión 3 mM, nicardipino 2 μM, adenosina 1 mM, fructosa 10 mM, glucosa 10 mM, insulina 100 U/l y Mops 20 mM;
 - (iv) NaCl 85-145 mM, KCl 3-6 mM, CaCl₂ 1,0-1,6 mM, KH₂PO₄ 0,7-1,3 mM, MgSO₄ 0,9-1,5 mM y adenosina 0,12-1,2 mM; o
 - (v) NaCl 115 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,30 mM, KH₂PO₄ 1 mM, MgSO₄ 1,2 mM, alopurinol 1 mM, desferrioxamina 1 mM, glutatión 3 mM y adenosina 0,12 mM.
3. La composición de la reivindicación 1 ó 2, en la que la composición comprende además un antioxidante.
4. Método *ex vivo* para conservar un órgano o tejido, comprendiendo el método poner en contacto el órgano o tejido con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Método *ex vivo* para reducir la lesión por reperusión de un órgano durante la cirugía y/o tras la extirpación del órgano de un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto el órgano con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
6. El método de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que el órgano o tejido es corazón, pulmón, riñón, páncreas, hígado, intestino, tejido endotelial, tejido vascular o piel.

Figura 1

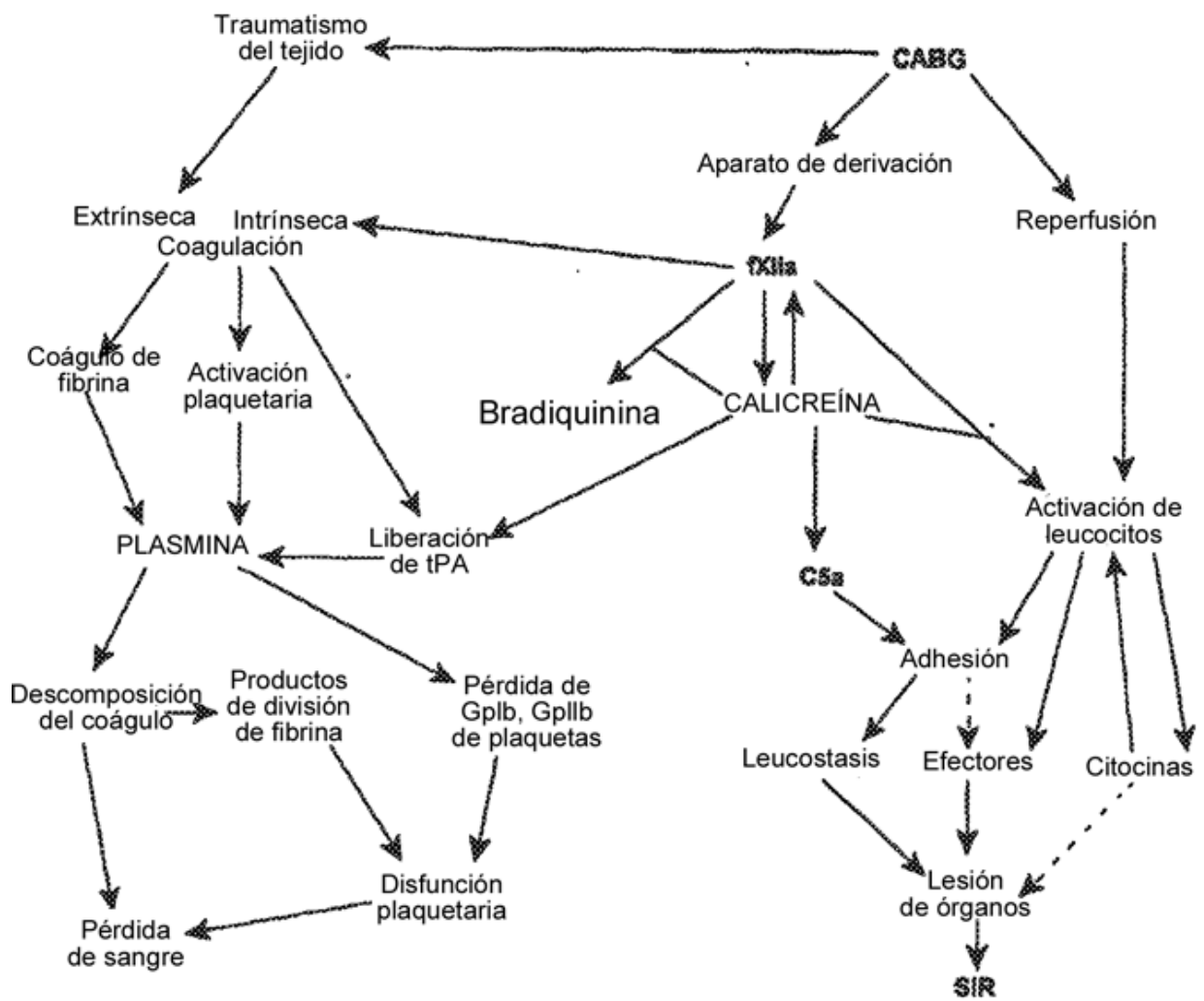


Figura 2

5'AOXI

-----+----- *Bst*I

CG ACT TTT AAC GAC AAC TTG AGA AGA TCA AAA AAC AAC TAA TTA TTC GAA

ACG ATG AGA TTC CCA TCT ATC TTC ACT GCT GTT TTG TTC GCT GCT
M R F P S I F T A V L F A A

TCC TCT GCT TTG GCT GCT CCA GTT AAC ACC ACT ACT GAA GAC GAG ACT
S S A L A A P V N T T T E D E T

GCT CAA ATT CCT GCT GAG GCT GTC ATC GGT TAC TCT GAC TTG GAA GGT
A Q I P A E A V I G Y S D L E G

GAC TTC GAC GTC GCT GTT TTG CCA TTC TCT AAC TCT ACT AAC AAC GGT
D F D V A V L P F S N S T N N G

TTG TTG TTC ATC AAC ACT ACC ATC GCT TCT ATC GCT GCT AAG GAG GAA
L L F I N T T I A S I A A K E E

GGT GTT TCC CTC GAG AAG AGA GAG GCT ATG CAC TCT TTC TGT GCT TTC
G V S L E K R E A M H S F C A F

AAG GCT GAC GAC GGT CCG TGC AGA GCT GCT CAC CCA AGA TGG TTC TTC
K A D D G P C R A A H P R W F F

AAC ATC TTC ACG CGT CAA TGC GAG GAG TTC ATC TAC GGT GGT TGT GAG
N I F T R Q C E E F I Y G G C E

GGT AAC CAA AAC AGA TTC GAG TCT CTA GAG GAG TGT AAG AAG ATG TGT
G N Q N R F E S L E E C K K M C

*Eco*R.I

ACT AGA GAC TAG TAA GAA TTC GCC TTA GAC ATG ACT GTT CCT CAG TTC
T R D * *

←-----
 3'AOXI

AAG TTG GGC ACT TAC GAG AAG
 3'AOXI

Figura 3

```

SEQ ID 2:      ----MHSFCAFKA-DDGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFIYGG
SEQ ID 4:      ----MHSFCAFKA-DDGPCKANHLRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 5:      ----MHSFCAFKA-DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEEFYGG
SEQ ID 6:      ----MHSFCAFKA-DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEQFTYGG
SEQ ID 7:      ----MHSFCAFKA-DDGHCKASLPRFFFNIFTRQCEEFIYGG
SEQ ID 8:      ----MHSFCAFKA-DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 9:      ----MHSFCAFKA-DDGHCKGAHLRFFFNIFTRQCEEFIYGG
SEQ ID 10:     ----MHSFCAFKA-DDGRCKGAHLRFFFNIFTRQCEEFIYGG
SEQ ID 11:     ----MHSFCAFKA-DGGRCRGAHPRWFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 12:     ----MHSFCAFKA-DDGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 13:     ----MHSFCAFKA-DVGRCRGAHPRWFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 14:     ----MHSFCAFKA-DVGRCRGAQPRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 15:     ----MHSFCAFKA-DDGSCRAAHLRWFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 16:     ----MHSFCAFKA-EGGSCRAAHQRWFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 17:     ----MHSFCAFKA-DDGPCRGAHLRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 18:     ----MHSFCAFKA-DDGHCRGALPRWFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 19:     ----MHSFCAFKA-DSGNCRGNLPRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 20:     ----MHSFCAFKA-DSGRCRGNHQRFFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 21:     ----MHSFCAFKA-DGGRCRAIQPRWFFNIFTRQCEEFYSYGG
SEQ ID 22:     ----MHSFCAFKA-DDGRCRGAHPRWFFNIFTRQCEEFYSYGG
    
```

```

SEQ ID 2:(cont.)    CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 4:(cont.)    CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 5:(cont.)    CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 6:(cont.)    CAGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 7:(cont.)    CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 8:(cont.)    CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 9:(cont.)    CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 10:(cont.)   CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 11:(cont.)   CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 12:(cont.)   CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 13:(cont.)   CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 14:(cont.)   CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 15:(cont.)   CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 16:(cont.)   CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 17:(cont.)   CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 18:(cont.)   CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 19:(cont.)   CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 20:(cont.)   CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 21:(cont.)   CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEQ ID 22:(cont.)   CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
    
```